



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

**Caracterización de *Escherichia coli* productora de toxina Shiga aislada desde perros y gatos de comunas de la Región Metropolitana**

**Valentina Lesly Vásquez Medina**

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

PROFESOR GUÍA: Nicolás Elías Galarce Gálvez  
Universidad de Chile

Financiamiento FONDECYT Iniciación N°11170363

SANTIAGO, CHILE  
AÑO 2019



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

**Caracterización de *Escherichia coli* productora de toxina Shiga aislada desde perros y gatos de comunas de la Región Metropolitana**

**Valentina Lesly Vásquez Medina**

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

Nota final: \_\_\_\_\_

Firma

Profesor Guía:	Dr. Nicolás Galarce	_____
Profesor Corrector:	Dra. Consuelo Borie	_____
Profesor corrector:	Dr. Patricio Retamal	_____

SANTIAGO, CHILE  
AÑO 2019

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi profesor guía el Dr. Nicolás Galarce, por permitirme participar en este proyecto, por su apoyo, dedicación y paciencia, que me permitieron desarrollar esta memoria de título.

A la Dra. Consuelo Borie por su ayuda y apoyo en el desarrollo de esta memoria.

A Beatriz y Fernando por su compañía diaria, ayuda y apoyo. Por ser parte de este gran equipo de trabajo durante el proyecto.

A mis compañeros de laboratorio, por su amistad y apoyo en cada una de las etapas de esta memoria de título.

A las personas que colaboraron en la recolección de muestras en las distintas comunas. Y a los dueños de las mascotas, por su buena disposición en querer que sus mascotas participarán en este estudio.

## **DEDICATORIA**

Esta Memoria de Título se la dedico a mis seres queridos a mi madre, a mi padre y a mi hermana. Por estar todos estos años de carrera a mi lado, apoyarme de manera incondicional.

A mis amigos, compañeros de la universidad y familiares que están pendientes de mí, apoyándome durante estos años de carrera.

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>SUMMARY</b> .....	2
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	3
<b>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....	5
Factores de Virulencia de STEC .....	5
Patogenia de STEC .....	8
Vías de transmisión .....	10
Impacto de STEC en la Salud Pública .....	10
STEC en perros y gatos .....	12
<b>HIPÓTESIS</b> .....	15
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	15
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	15
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	16
Diseño .....	16
Obtención de las muestras .....	16
Identificación de STEC .....	17
Caracterización de la virulencia .....	18
Expresión y análisis de los resultados .....	19
Normas de bioseguridad .....	19
<b>RESULTADOS</b> .....	21
<b>DISCUSIÓN</b> .....	24
<b>CONCLUSIONES</b> .....	28
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	29

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Secuencia de los partidores para la detección de los genes <i>stx1</i> y <i>stx2</i> , y tamaño del amplicón esperado del PCR utilizado. ....	18
<b>Tabla 2.</b> Secuencia de los partidores a utilizar para la detección de los genes <i>eae</i> , <i>hlyA</i> , <i>lpf</i> y <i>saa</i> , y tamaño del amplicón esperado del PCR. ....	19

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> STEC colonizando el epitelio intestinal humano (Farfan y Torres, 2012).....	9
<b>Figura 2.</b> Distribución de muestras obtenidas desde perros en relación al sexo (n=300).21	
<b>Figura 3.</b> Distribución de las edades de los perros muestreados (n=300). ....	22
<b>Figura 4.</b> Distribución de muestras obtenidas desde gatos en relación al sexo (n=300).22	
<b>Figura 5.</b> Distribución de las edades de gatos muestreados (n=300).....	22
<b>Figura 6.</b> Desarrollo de las muestras obtenidas desde perros (n=300). ....	23
<b>Figura 7.</b> Desarrollo de las muestras obtenidas desde gatos (n=300).....	23

## **RESUMEN**

*Escherichia coli* productora de toxina Shiga (STEC) es un patógeno zoonótico emergente, que puede causar enfermedades severas en humanos, como colitis hemorrágica (CH) y síndrome hemolítico urémico (SHU). Se han reportado infecciones con STEC en personas producto del contacto directo con animales de compañía, y de estos se han aislado cepas de este patógeno con virulotipo asociado a enfermedad severa. Sin embargo, en Chile a la fecha no se encuentra información disponible al respecto. Por esta razón, este proyecto busca aportar con información sobre la caracterización de cepas de STEC circulantes en parte de la población canina y felina nacional.

Para cumplir con lo anterior, se recolectaron torulados rectales de 300 perros y 300 gatos mascotas, entre octubre y diciembre del año 2018. Se realizaron dos rondas de cultivo, en caldo tripticasa de soya y en agar MacConkey; y mediante PCR se buscó determinar la presencia de los genes *stx1* y *stx2* con el fin de identificar cepas de STEC en las muestras obtenidas. Además, se contempló la detección de los genes *eae*, *lpf*, *saa* y *hlyA* en las cepas de STEC aisladas. Sin embargo, con esta metodología no fue posible el aislamiento de cepas de STEC en las muestras procesadas.

En vista de los resultados obtenidos podemos concluir que los perros y gatos con dueño en algunas comunas de la Región Metropolitana representarían un riesgo bajo en la transmisión de cepas de STEC con determinantes de virulencia asociados a CH y SHU en las personas. Sin embargo, es necesaria la realización de otros estudios, con un mayor tamaño muestral y que analicen las distintas variables que puedan afectar la colonización de STEC en estos animales.

*Palabras clave:* STEC; mascotas; gatos; perros; factores de virulencia.

## SUMMARY

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) is an emerging zoonotic pathogen, which can cause severe diseases in humans, such as hemorrhagic colitis (HC) and haemolytic uraemic syndrome (HUS). Infections have been reported in people as a result of direct contact with companion animals, and from these STEC strains with virulotype associated with severe disease have been isolated. However, to date in Chile there is no information available about it. For this reason, this project seeks to provide information on the characterization of circulating STEC strains in part of the national dog and cat population.

In order to comply with the above, rectal swabs from 300 dogs and 300 pet cats were collected between October and December of 2018. Two rounds of culture were carried out in tripticase soy broth and on MacConkey agar; and by means of PCR, the presence of the *stx1* and *stx2* genes was attempted in order to identify STEC strains in the samples obtained. In addition, the detection of *eae*, *lpf*, *saa* and *hlyA* genes in the isolated STEC strains was contemplated. However, with this methodology it was not possible to isolate STEC strains in the processed samples.

In view of the results obtained, we can conclude that household dogs and cats in some communes of the Metropolitan Region would represent a low risk in the transmission of STEC strains with virulence determinants associated with HC and HUS in people. However, it is necessary to carry out further studies, with a larger sample size and that address the different variables that may affect the colonization of STEC in these animals.

*Keywords:* STEC; pets; cats; dogs; virulence factors.



## INTRODUCCIÓN

*Escherichia coli* productora de toxina Shiga (STEC, por sus siglas en inglés) se reconoce como un patógeno zoonótico emergente que puede causar diferentes cuadros de enfermedad en humanos, los que van desde diarrea acuosa a colitis hemorrágica, incluyendo complicaciones más severas como el síndrome hemolítico urémico.

STEC se caracteriza por la producción de toxina Shiga, pudiendo presentar la toxina Shiga tipo 1 (codificada por el gen *stx1*), la toxina Shiga tipo 2 (codificada por el gen *stx2*), o ambas, siendo estos sus factores de virulencia más importantes. Además, puede presentar otros determinantes de virulencia que participan en la producción de enfermedad severa. Entre estos factores se encuentran los que permiten la adherencia a las células epiteliales, como la intimina (codificada por el gen *eae*), la cual está presente en las cepas más virulentas; la adhesina autoaglutinante STEC (codificada por el gen *saa*), y las fimbrias polares largas (codificada por el gen *lpf*). Además, la mayoría de las cepas de STEC producen una hemolisina (codificada por el gen *hlyA*), la que posee acción citotóxica en las células endoteliales. Cabe destacar que no todas las cepas de STEC poseen los mismos factores de virulencia, siendo algunas combinaciones de estos, o virulotipos, asociadas más frecuentemente a cuadros severos de enfermedad en las personas. Estas cepas con virulotipos asociados a enfermedad severa en personas han sido aisladas desde diferentes especies animales, como bovinos, porcinos, ovinos, entre otros; pero en animales de compañía esta información es escasa.

Diversas especies animales pueden actuar como portadores de STEC, y la mayoría de estos se consideran como reservorios y diseminadores, pudiendo transmitir el patógeno a otros animales, el medio ambiente y a las personas. Debido a esta diversidad de reservorios y las diferentes vías de infección, la enfermedad en personas es común. En el caso particular de perros y gatos, producto de su estrecha interacción con sus propietarios, existe una alta posibilidad de transmisión de este patógeno. Además, estudios internacionales han reportado la detección de cepas de STEC con el mismo virulotipo en mascotas y sus propietarios, lo que refuerza el rol de estas como posibles reservorios de STEC. En Chile no se encuentra información disponible al respecto a la fecha.

Por lo expuesto anteriormente, en esta Memoria de Título se pretendió detectar y caracterizar cepas de *E. coli* productora de toxina Shiga en perros y gatos mascotas de la Región Metropolitana. Así, se buscó revelar con datos actuales el papel de estos animales como reservorios de cepas de STEC asociadas a cuadros severos de enfermedad en las personas, contribuyendo a solucionar la falta de información existente en nuestro país sobre un tema que constituye un riesgo para la salud pública.

## **REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

Las cepas de la especie *Escherichia coli* corresponden a bacilos Gram negativos, anaerobios facultativos, pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*. Son un grupo genéticamente heterogéneo, cuyos miembros son generalmente comensales del tracto gastrointestinal de varias especies animales, principalmente mamíferos (Rivas *et al.*, 2016). Sin embargo, ciertas cepas de esta especie han adquirido genes que les permiten causar enfermedad intestinal y extraintestinal. Las cepas que causan enfermedad entérica, incluyen varios patógenos emergentes de importancia mundial para la salud pública, y en función de sus factores de virulencia y los mecanismos por los que causan enfermedad Nataro y Keper (1998) agruparon estas cepas en patotipos diarreogénicos y extraintestinales. Dentro de los patotipos diarreogénicos se incluyen: *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* de adherencia difusa (DAEC) y *E. coli* productora de toxina Shiga (STEC) (Kaper *et al.*, 2004).

STEC comprende a un patógeno emergente de gran importancia en salud pública, debido a su carácter zoonótico, y a que se asocia a casos esporádicos y brotes de enfermedades severas como colitis hemorrágica (CH) y síndrome hemolítico urémico (SHU) en las personas (Rivas *et al.*, 2016).

### **Factores de Virulencia de STEC**

La característica distintiva de STEC es la capacidad de producir una o más citotoxinas de la familia de la toxina Shiga (Stx), codificados en prófagos, pudiendo presentar la toxina Shiga tipo 1 (Stx1) codificada por el gen *stx1*, la toxina Shiga tipo 2 (Stx2) codificada por el gen *stx2*, o ambas (Paton *et al.*, 2001). Stx1 y Stx2 comparten estructura, actividad biológica, aproximadamente un 55% de homología de aminoácidos, pero son antigénicamente diferentes (Keper *et al.*, 2004; Rivas *et al.*, 2016). Además, estas toxinas poseen diversas variantes. Así, la Stx1 posee las variantes Stx1a, Stx1c y Stx1d; mientras que la subfamilia Stx2 incluye a las variantes Stx2a, Stx2b, Stx2c, Stx2d, Stx2e, Stx2f y Stx2g. Estas variantes difieren en sus características fisicoquímicas y de toxicidad (Rivas *et al.*, 2016). En este sentido, se ha informado que las cepas que producen Stx2 son más

virulentas que las cepas que producen solo Stx1 o Stx1 y Stx2 (Nataro y Kaper, 1998; Scheutz *et al.*, 2012). Además, se ha demostrado que Stx2 es aproximadamente 1.000 veces más tóxico para las células endoteliales microvasculares renales humanas que Stx1 (Gyles, 2007). La Stx es una toxina compuesta por dos subunidades (A y B). En su acción celular, la subunidad B se une a su receptor celular globotriaosilceramida (Gb3), el cual se expresa en la superficie de las células endoteliales, permitiendo la unión física de la toxina con la célula. Posteriormente, la subunidad A, que tiene función catalítica sobre el ARN ribosomal, ingresa al citoplasma de la célula, produciendo el cese de la síntesis proteica (Kaper *et al.*, 2004; Ibarra *et al.*, 2008). Esto provoca una respuesta de estrés ribotóxica, que finalmente conduce a la apoptosis de la célula (Schüller, 2011).

Además de las Stx, STEC puede presentar otros factores de virulencia que son cruciales en la producción de enfermedad severa en las personas. Entre estos factores de virulencia podemos encontrar adhesinas, hemolisinas, y sideróforos, entre otros. Las adhesinas de STEC, entre las que destacan la intimina, la adhesina autoaglutinante STEC, y las fimbrias polares largas, le permiten adherirse al epitelio intestinal, contribuyendo a la patogénesis de la enfermedad en animales y personas (Paton *et al.*, 2001; Croxen *et al.*, 2013).

Entre las cepas más virulentas de STEC se encuentran las que producen alteraciones en la morfología de los enterocitos, propiedad mediada por una isla de patogenicidad denominada “locus de borrador del enterocito” (LEE por sus siglas en inglés) (Paton *et al.*, 2001), que se asocia con la adherencia íntima a las células epiteliales. Esta isla se identificó originalmente de EPEC, y comparte un 86% de identidad nucleotídica con la identificada en cepas de STEC (McWilliams y Torres, 2014). En este locus se encuentran todos los genes necesarios para esta adhesión, que codifican para un sistema de secreción tipo III (SST3), destacando entre ellos la proteína intimina (codificada por el gen *eae*) de la membrana externa, el receptor traslocado de intimina (Tir) que se moviliza a la membrana de la célula hospedera, y varias proteínas efectoras secretadas (Esp), que son homólogas a las producidas por EPEC (Paton *et al.*, 2001).

A pesar de lo anterior, no todas las cepas de STEC poseen el locus LEE. Estas cepas se denominan LEE-negativas, y también se han asociado con enfermedad severa en humanos, lo que ha sugerido la existencia de otros factores de virulencia necesarios para la adhesión

de STEC (Rivas *et al.*, 2016). Entre estos, se encuentra la adhesina autoaglutinante STEC, codificada en el gen *saa*, localizado a nivel plasmidial. Saa es una proteína de membrana externa, que confiere un fenotipo de adherencia semi-localizado a las microvellosidades apicales de las células epiteliales intestinales (Paton *et al.*, 2001). Este factor de virulencia se encuentra en cepas LEE-negativas frecuentemente asociadas con SHU (Paton *et al.*, 2001; Jenkins *et al.*, 2003).

Otro importante factor de adherencia que puede contribuir en las primeras etapas de la colonización son las fimbrias polares largas (Lpf), codificadas por el gen *lpf*. Esta fimbria se une con las proteínas de la matriz extracelular (MEC), específicamente con fibronectina, laminina y colágeno IV (Torres *et al.*, 2002). Originalmente fue caracterizada en *Salmonella* spp., y además de estar presente en STEC también se encuentra en otras cepas de *E. coli* patógenas e incluso algunas cepas comensales (McWilliams y Torres, 2014). Se ha descrito que este factor de virulencia se puede encontrar tanto en cepas LEE-positivas como en LEE-negativas (Paton *et al.*, 2001; McWilliams y Torres, 2014)

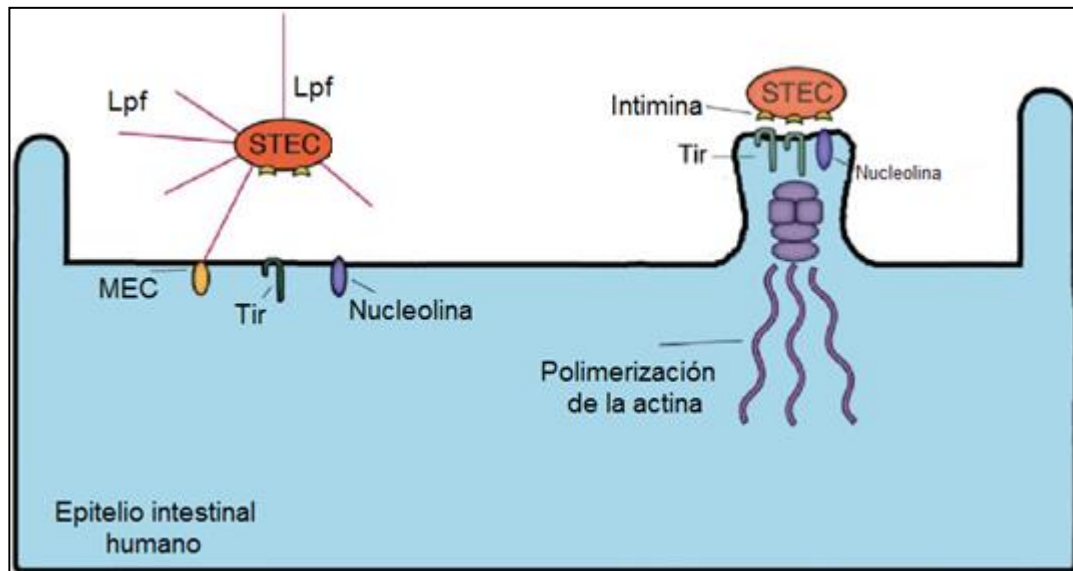
Como se mencionó anteriormente, las cepas de STEC también pueden presentar hemolisinas entre sus factores de virulencia. Así, la mayoría de las cepas de STEC producen una hemolisina codificada por el gen *hlyA*, ubicado en un plásmido (Rivas *et al.*, 2016). Esta hemolisina es una toxina formadora de poros que lisa los eritrocitos, y permite la utilización del hierro asociado a ellos como potencial fuente nutricional (Glyles, 2007). Posee acción citotóxica para células endoteliales, y se encuentra en la mayoría de las cepas de STEC que se han asociado con el desarrollo de SHU (Croxen *et al.*, 2013; Krause *et al.*, 2018).

Debe señalarse que no todas las cepas de STEC poseen los mismos factores de virulencia, constituyendo diferentes virulotipos, es decir cepas de STEC con diferentes perfiles de genes de virulencia. Además, debido a la constante evolución bacteriana, en los últimos años han emergido clones híper-virulentos de STEC de distribución mundial, y otras cepas de STEC con combinaciones novedosas y poco frecuentes de determinantes de virulencia (Rivas *et al.*, 2016), como la cepa responsable de un brote de SHU en Alemania el año 2011, que afectó inusualmente a una alta proporción de adultos. Esta cepa de STEC presentó un patrón de virulencia inusual que combina la producción de Stx2 con la

adherencia enteroagregativa de cepas EAEC (Beutin y Martin, 2012). Esta situación resalta la importancia de no sólo detectar las toxinas Stx, sino además caracterizar otros factores de virulencia en este patógeno.

### **Patogenia de STEC**

Para ejercer su acción patógena, las cepas de STEC deben llegar al colon, donde producto de las señales ambientales (temperatura, pH y osmolaridad, presencia de bicarbonato, calcio y nitrato férrico), activa sus genes de virulencia. En la primera fase de colonización participan las fimbrias polares largas que se unen a proteínas de la MEC (Farfán y Torres, 2012; McWilliams y Torres, 2014), tal como se mencionó anteriormente. Tras esta interacción inicial, en cepas LEE-positivas, a través del SST3 permiten la entrada de las proteínas efectoras al enterocito, ingresa la proteína Tir que se ubica en la superficie de la membrana del enterocito donde actúa como receptor para la intimina bacteriana, produciéndose la adherencia íntima característica (Gyles, 2007; Rivas *et al.*, 2016). La intimina también se puede unir a la nucleolina de los enterocitos, con la misma afinidad que Tir, pero esta interacción es más débil (McWilliams y Torres, 2015). Esta interacción culmina en una señal que promueve la polimerización de actina ocasionando la lesión que implica cambios estructurales en la célula epitelial que incluyen pérdida de microvellosidades, y formación de estructuras semejantes a pedestales (Farfán y Torres 2012; Farfán-García *et al.*, 2016). La eliminación y pérdida de la capacidad de absorción de las microvellosidades probablemente contribuya a la diarrea inducida por estas bacterias (Gyles, 2007; Rivas *et al.*, 2016). Por otro lado, se sabe mucho menos sobre la adherencia de STEC en las cepas LEE-negativas. Sin embargo, se ha descrito que la proteína Saa juega un rol importante en este tipo de cepas. Así, Saa es la que participa en la adhesión al enterocito (Paton y Paton, 2002), produciendo áreas de eliminación de microvellosidades, pero sin producir la típica lesión en pedestal de las cepas LEE positivas (Gyles. 2007). En la Figura 1 de diagrama el proceso de colonización de STEC en el epitelio intestinal humano, y la formación de la lesión en pedestal.



**Figura 1.** STEC colonizando el epitelio intestinal humano y formación de la lesión en pedestal (Farfan y Torres, 2012).

Posterior a la adhesión, la bacteria comienza a secretar sus toxinas Stx, las que deben atravesar el epitelio intestinal, que forma una barrera hermética para evitar la entrada de contenido luminal en el tejido subyacente. El mecanismo de este proceso sigue sin estar del todo claro, ya que no hay modelos animales apropiados disponibles para estudiar este aspecto de la infección por STEC. Existen varias rutas posibles de translocación de Stx, como a través de transcitosis independiente de Gb3, o a través de las uniones estrechas. Este último, ya sea a causa de la redistribución de las proteínas de las uniones estrechas intercelulares, que conducen a una función de barrera epitelial disminuida, producida por las proteínas efectoras del SST3. Otra vía propuesta es que las Stx traspasen esta barrera durante la trans migración de los neutrófilos desde la mucosa a la luz intestinal (Schüller, 2011). Una vez ya traspasado el epitelio intestinal, Stx llega hasta el torrente sanguíneo y se distribuye a los distintos órganos, hasta llegar a tejidos con alta concentración de Gb3, donde puede ejercer su acción patógena. Así, en los endotelios vasculares, que son ricos en Gb3, provoca daño mediante la inhibición de la síntesis de proteínas, lo que produce una respuesta de estrés ribotóxica, que es a la vez proinflamatoria y proapoptótica. Las toxinas Stx inducen apoptosis en células epiteliales intestinales y produce daño local a los vasos sanguíneos, que se acompaña de inflamación severa y daño de la mucosa de ciego y colon ascendente, lo que puede producir colitis hemorrágica (Kaper *et al.*, 2004; Gyles, 2007). El

receptor Gb3 se encuentran en mayor número en células endoteliales glomerulares en niños, por lo que los riñones son sitios que con frecuencia se ven afectados (Dell'Orco *et al.*, 2005). En el riñón, daña las células endoteliales y ocluye la microvasculatura a través de una combinación de toxicidad directa e inducción de la producción de citoquinas y quimioquinas locales, lo que resulta en inflamación renal. Estos eventos pueden causar la adhesión y agregación de las plaquetas a las células endoteliales que promueven el proceso hemostático que resulta en trombosis renal. Los trombos causan isquemia irreversible que conduce a insuficiencia renal aguda. Este daño puede conducir a SHU, que se caracteriza por anemia hemolítica, trombocitopenia e insuficiencia renal aguda, la que es potencialmente mortal (Gyles, 2007; Schüller, 2011). La hemolisina también contribuye al desarrollo de SHU a través de su acción citotóxica en las células endoteliales y la lisis de eritrocitos (Croxen *et al.*, 2013; Krause *et al.*, 2018). Aunque los riñones son blancos frecuentes en el SHU, una amplia gama de órganos, incluidos el sistema nervioso central, los pulmones, el páncreas y el corazón pueden verse afectados (Gyles, 2007; Schüller, 2011).

### **Vías de transmisión**

STEC ha sido implicado en numerosos brotes de infecciones entéricas en todo el mundo, principalmente asociados al consumo de alimentos contaminados, como carne cruda o insuficientemente cocida, productos lácteos no pasteurizados, vegetales crudos y agua (Figuerola, 2017). Otras posibles vías de transmisión son el contacto de aguas y suelos contaminados, de persona a persona por la vía oral-fecal, y en los últimos años comenzaron a aumentar los reportes de infecciones en personas producto del contacto directo con animales (Rivas *et al.*, 2016), lo que se ve facilitado por poseer una dosis infecciosa extremadamente baja (<100 células) (Kaper *et al.*, 2004).

### **Impacto de STEC en la Salud Pública**

Debido a la diversidad de reservorios y vías de infección, la infección en las personas es frecuente. Las manifestaciones clínicas relacionadas con las infecciones por STEC pueden variar desde portadores asintomáticos a diarrea leve, o incluso hasta presentaciones clínicas



más graves como CH y al potencialmente mortal SHU, como se ha mencionado anteriormente.

Aunque la incidencia de STEC varía en todo el mundo, la importancia y el impacto de los brotes de CH y SHU en la salud pública es enorme (Rivas *et al.*, 2016). La enfermedad intestinal es inicialmente acuosa, seguida de diarrea sanguinolenta por aproximadamente 8 días. La mayoría de los pacientes se recupera dentro de los primeros 10 días, pero en una pequeña proporción de pacientes (5-10%), que son más susceptibles a complicaciones graves, la infección puede conducir a una enfermedad potencialmente mortal como el SHU en niños menores de 5 años (Gyles, 2007), y producir púrpura trombocitopénica trombótica en ancianos (Rivas *et al.*, 2016). Este últimos se parece mucho al SHU en sus características clínico-patológicas, y se caracteriza por producir fiebre y alteraciones del sistema nervioso central, anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia y, en ocasiones, insuficiencia renal aguda (Dell'Orco *et al.*, 2005).

Dentro de los diferentes cuadros que STEC puede causar en personas, el SHU es el más grave, afectando principalmente a recién nacidos y niños menores de 10 años, con una tasa de letalidad que varía entre 3 y 5%, y es la principal causa de insuficiencia renal aguda en niños pequeños y la segunda de insuficiencia renal crónica (IRC) en ellos (Bentancor *et al.*, 2007; Mele *et al.*, 2014). Adicionalmente, STEC puede causar secuelas neurológicas en el 25% de los pacientes con SHU y secuelas renales crónicas, generalmente leves, en alrededor del 50% de los supervivientes (Bentancor *et al.*, 2007), mientras que en los casos más graves de SHU puede ocasionar la muerte del paciente o secuelas renales permanentes, como la necesidad de someterse a un trasplante renal (Figueroa, 2017). Chile es el tercer país con mayor incidencia de SHU en todo el mundo, con una tasa de letalidad del 3-5% en niños menores de cinco años (Hormazábal, 2011). En Chile, el SHU es una causa frecuente de insuficiencia renal aguda e importante causa de insuficiencia renal crónica, con una incidencia de 3,2/1.000.000 de pacientes menores de 4 años, y es responsable del 8% de los trasplantes renales en pacientes pediátricos chilenos producto de la IRC terminal por esta etiología (Zambrano *et al.*, 2008). En este contexto, y de acuerdo a datos oficiales entregados por el Instituto de Salud Pública de Chile (ISP), de las 2.196 cepas de origen clínico de personas con CH y/o SHU recibidas para confirmación por este organismo

durante el periodo 2010–2016, el 27,6% fue confirmado como STEC (ISP, 2017). Además, debe mencionarse que desde el año 2004 STEC es objeto de vigilancia de laboratorio, sin ser el SHU de notificación obligatoria. A pesar de esto, la real incidencia de STEC en Chile esta subestimada, dado que la mayoría de los casos queda sin confirmación de laboratorio (Figueroa, 2017).

### **STEC en perros y gatos**

Las cepas de STEC asociadas a enfermedad severa en las personas pueden encontrarse en diferentes especies animales de forma comensal. El ganado vacuno y ovino son considerados reservorios naturales de este patógeno, aunque también se ha encontrado en otras especies animales, tanto silvestres como domésticas, como cerdos, gatos y perros (Fagan *et al.*, 1999).

Históricamente, perros y gatos han tenido una interacción cercana con los humanos, viviendo en estrecho contacto durante miles de años. Como consecuencia, los contactos entre humanos y estos animales son cotidianos, por lo que la posibilidad de transmisión de microorganismos, incluyendo STEC, entre estas diferentes especies hospederas es extremadamente alta (Bentancor *et al.*, 2007).

Perros y gatos pueden presentar STEC en su microbiota intestinal, con tasas de prevalencia reportadas a nivel internacional de 1,1% al 15,5% en perros, y entre 2,7% a 13,8% en gatos pero no se ha demostrado que cause signos asociados a enfermedad en ellos (Beutin *et al.*, 1993; Gallego *et al.*, 2006; Bentancor *et al.*, 2007; Bentancor *et al.*, 2008). Además, se ha informado un caso de un perro con signos clínicos similares a SHU, donde se le detectó anemia hemolítica microangiopática con hemólisis intravascular, trombocitopenia e insuficiencia renal aguda; aunque en este caso no está claro si el SHU fue producido por STEC, debido a que no se realizó un cultivo confirmatorio (Dell’Orco *et al.*, 2005).

Si bien la dirección de la transmisión de cepas de STEC entre estos animales y sus dueños es difícil de comprobar, sí se han aislado cepas de STEC con los mismos virulotipos desde animales y sus propietarios. Así, en el estudio de Busch *et al.* (2007) en Alemania, aislaron una cepa de STEC con virulotipo *stx1/stx2/eae/hlyA* desde una niña de dos años que presentaba colitis hemorrágica y vómito. Después de descartar otras posibles vías de

infección, analizaron a su gato, del cual aislaron una cepa de STEC que mediante un análisis de polimorfismo de fragmentos de restricción demostraron que la cepa aislada de la niña y su gato era la misma.

De forma similar, Rumi *et al.* (2012) en Argentina, reportaron el caso de un niño de 12 años enfermo de SHU. Después de excluir otras posibles vías de infección analizaron a sus mascotas, un perro sano y un gato sano, los cuales vivían en estrecho contacto con los dueños. A través de muestreos semanales de estos animales, se logró el aislamiento de dos cepas diferentes de STEC, una en el perro y la otra en el gato. Ambas cepas presentaron el gen *stx2*, el que se encuentra en las cepas más virulentas. Adicionalmente, la cepa aislada desde el gato presentó el mismo virulotipo (*stx2/eae/hlyA*) que la cepa aislada del niño, aunque diferían antigénicamente. Cabe destacar que este virulotipo se ha descrito en diversas cepas aisladas desde pacientes con SHU (Miliwebsky *et al.*, 2007).

El mismo año, Bentancor *et al.* (2012) en Argentina, relacionaron mediante electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) una cepa de STEC que poseía el gen *stx2* aislada desde un perro, determinando que poseía un 100% de identidad genómica a una cepa aislada desde un caso clínico de colitis hemorrágica en 2001. Además, aislaron una cepa con virulotipo *stx2/hlyA* de dos gatos, que presentaba el mismo serotipo que cepas de tres casos clínicos de SHU, pero no se compararon mediante el PFGE. En este mismo estudio los autores demostraron que existía identidad clonal entre cepas aisladas de perros y gatos con cepas aisladas desde bovinos.

Estos estudios corroboran el rol de las mascotas como reservorio de cepas de STEC capaces de producir cuadros severos en las personas, y que probablemente sirvan como vehículo para las cepas bovinas en el ciclo de la infección humana.

A pesar de la existencia de diversos estudios internacionales que describen el rol de los animales domésticos como reservorios de cepas de STEC con virulotipos asociados a enfermedad severa en las personas, en Chile este tipo de estudios es escaso. Más aún, en el caso particular de perros y gatos, a la fecha no existen estudios publicados en nuestro país. Cabe señalar que en Chile, según el estudio de Correira (2018), el 64% de los hogares chilenos tiene mascotas, y de ellos más de la mitad de los hogares (54%) tienen perros,

mientras que en el 25% tienen gatos, y en 15,7% de los hogares conviven gatos y perros. En las casas con niños la cifra aumenta hasta un 70%, siendo ellos uno de los grupos de riesgo más susceptibles a infecciones por STEC.

Por lo expuesto anteriormente, en esta Memoria de Título se pretende caracterizar el virulotipo de cepas de *E. coli* productora de toxina Shiga aisladas desde perros y gatos mascota de la Región Metropolitana. Así, se busca revelar con datos actuales el papel de estos animales como reservorios de cepas de STEC capaces de producir cuadros graves en la población, contribuyendo con información novedosa a un tema que constituye un riesgo para la salud pública nacional.

## **HIPÓTESIS**

Las cepas de *Escherichia coli* productoras de toxina Shiga aisladas desde perros y gatos con dueño en algunas comunas de la Región Metropolitana presentan determinantes de virulencia asociados a colitis hemorrágica y síndrome hemolítico urémico en las personas.

## **OBJETIVO GENERAL**

Caracterizar el virulotipo de cepas de *Escherichia coli* productora de toxina Shiga aisladas desde perros y gatos mascotas desde seis comunas de la Región Metropolitana.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Identificar la presencia de cepas de *Escherichia coli* productora de toxina Shiga en deposiciones de perros y gatos mascotas, determinando la distribución de los genes *stx1* y *stx2*.
2. Determinar la presencia de los genes de virulencia *eae*, *hlyA*, *lpf* y *saa* en las cepas de STEC aisladas desde perros y gatos.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Diseño**

Se realizó un estudio observacional descriptivo para identificar la presencia de cepas de STEC en deposiciones de perros y gatos mascota, caracterizando el perfil toxigénico de las cepas aisladas, y determinando la portación de los genes de virulencia *eae*, *hlyA*, *lpf* y *saa*. El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Microbiología Veterinaria, perteneciente al Departamento de Medicina Preventiva Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, financiado por el Proyecto FONDECYT de Iniciación n° 11170363.

Se realizó un muestreo por conveniencia en clínicas y hospitales veterinarios ubicados en las comunas La Pintana, Puente Alto, Providencia, Paine, Renca y Santiago de la Región Metropolitana, durante octubre a diciembre del 2018. Para la obtención de las muestras se consideraron animales sin diarrea y que tampoco estuviesen recibiendo terapia antimicrobiana al menos en las últimas dos semanas previas.

Para el cálculo del tamaño muestral se consideró una confianza del 95%, un error  $\alpha$  del 5%, y prevalencias de un 10,2% en perros y 11,25% en gatos, promediando las prevalencias reportadas por Beutin *et al.*, (1993) y Bentancor *et al.*, (2007), lo que dio como resultado 220 muestras de cada especie. Considerando este tamaño muestral, y las prevalencias reportadas, se amplió a 300 muestras de cada especie, con el fin de obtener una mayor cantidad de información a evaluar.

Para la realización de este estudio se contó con un certificado de bioética emitido por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA) de la Universidad de Chile (Anexo 1) y con un certificado de bioseguridad emitido por el Comité de Bioseguridad de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile (Anexo 2).

### **Obtención de las muestras**

En las clínicas y hospitales de las comunas antes señaladas, a los dueños de perros y gatos mascotas se les explicó el estudio y se les consultó si deseaban que su mascota participara en él, considerando que las mascotas debían cumplir con los requisitos antes descritos. A

los dueños se les entregó un consentimiento informado (Anexo 3) por escrito, el cual debían firmar, autorizando así el muestreo de la mascota, y completando la información requerida de la misma (nombre, edad y sexo).

La toma de muestras se realizó con tómulas estériles con medio de transporte Cary Blair (BD®). La tórula fue introducida en el recto del animal al menos 2 cm aproximadamente, y girada suavemente durante al menos 10 s. Una vez obtenidas las muestras, las tómulas fueron introducidas en sus contenedores, registrando la especie a la cual pertenece, y luego transportadas al laboratorio en cajas aislantes a temperatura de refrigeración (4-6°C). En caso de no poder transportar inmediatamente las muestras al laboratorio, estas se mantuvieron refrigeradas por un máximo de 48 h hasta ser recolectadas por personal del laboratorio.

### **Identificación de STEC**

Una vez obtenidas las muestras, se depositaron en tubos con 6 mL de caldo tripticasa de soya (TS, BD®), se homogenizaron en vórtex, y se incubaron a 42°C durante 18-24 h. Luego de esta incubación, 3 alícuotas fueron sembradas con asa calibrada de 10 µL en placas de agar MacConkey (BD®), las que se incubaron a 37°C durante 18-24 h. Luego de esto, se tomó un inóculo desde el área confluyente de crecimiento bacteriano con asa calibrada estéril para determinar la presencia de STEC, mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para ello, el inóculo se suspendió en tubos de microcentrífuga con 500 µL de agua libre de nucleasas, se homogenizaron en vórtex, y se incubaron a 100°C durante 15 min en baño termorregulado (Aquabath®). Luego se centrifugaron durante 5 min a 16.500 rpm. El sobrenadante obtenido fue transferido a otro tubo de microcentrífuga estéril para ser utilizado como templado en la reacción de PCR.

A continuación, se realizó un PCR multiplex en un termociclador LifeECO de Bioer®, con el fin de detectar la presencia de los genes *stx1* y *stx2*, de acuerdo al protocolo de Cebula *et al.* (1995). La Tabla 1 muestra la secuencia de los partidores utilizados para cada uno de los genes y el tamaño esperado del amplicón. Como control positivo se utilizó la cepa STEC/97 aislada desde bovinos en matadero y caracterizada previamente por la Dra. Consuelo Borie, y como control negativo la cepa de *E. coli* ATCC 25922.

Posterior al PCR, y para poder visualizar los amplicones, se realizó electroforesis en gel de agarosa al 2%, en buffer tris acetato EDTA (PureExtreme®) adicionado con 6 µL de SafeView Plus™ 0,02%, a 90 V durante 45 min. Para ello, cada pocillo del gel se cargó con 5 µL del amplificado. Se utilizó un marcador de peso molecular que contiene fragmentos de ADN entre los 100 y 1.500 pares de bases (pb) (Maestrogen®). Posteriormente, las bandas obtenidas se visualizaron en un transiluminador LED (Maestrogen®) y fueron fotografiadas digitalmente para su registro.

En caso de obtener muestras positivas a la presencia de *stx1* y/o *stx2* en el PCR, se debería proceder a la identificación de las colonias positiva. De cada placa de agar MacConkey positiva a STEC, se seleccionarían al menos 30 colonias, las cuales se sembrarían nuevamente y de forma individual en placas de agar MacConkey (BD®) para repetir el procedimiento recién descrito de PCR y electroforesis.

**Tabla 1.** Secuencia de los partidores para la detección de los genes *stx1* y *stx2*, y tamaño del amplicón esperado del PCR utilizado.

Gen	Secuencias de los partidores (5'-3')	Tamaño esperado del amplicón (pb)	Referencia
<i>stx1</i>	F:CAGTTAATGTGGTGGCGAAGG R:CACCAGACAATGTAACCGCTG	348	Cebula <i>et al.</i> (1995)
<i>stx2</i>	F:ATCCTATTCCCGGGAGTTTACG R:GCGTCATCGTATACACAGGAGC	584	

F: forward; R: reverse.

### Caracterización de la virulencia

Todas las colonias identificadas como STEC serían sometidas a PCR para detectar la presencia de cuatro genes de virulencia. Los genes a detectar incluyeron a los genes *eae*, *hlyA*, *lpf* y *saa*. Los partidores a utilizar y tamaño de amplicón esperado se muestran en la Tabla 2. Para realizar esta determinación, se utilizaría el ADN previamente extraído y se realizarían PCR convencional. Para ello se utilizarían 12,5 µL de master mix, 5 µL de cada primer, y 5 µL ADN templado. Las reacciones de PCR se realizarían siguiendo los protocolos de Paton y Paton (1998) para el gen *hlyA*, de Paton y Paton (2002) para *saa*, de



Vidal *et al.* (2004) para *eae*, y de Vidal *et al.* (2007) para *lpf*. La electroforesis se realizaría de la misma forma detallada anteriormente. Como control positivo para la detección de los genes *eae* y *hlyA* se utilizaría la cepa STEC/97, mientras que en ausencia de control positivo de los genes *lpf* y *saa*, algunos de los productos de PCR obtenidos serían enviados a secuenciar a la Unidad de Secuenciación Automática de ADN de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica de Chile. Las secuencias obtenidas serían comparadas con la base de datos disponible en GenBank® para confirmar su identidad nucleotídica.

**Tabla 2.** Secuencia de los partidores para la detección de los genes *eae*, *hlyA*, *lpf* y *saa*, y tamaño del amplicón esperado del PCR.

Gen	Secuencias de los partidores (5'-3')	Tamaño esperado del amplicón (pb)	Referencias
<i>eae</i>	F:TCAATGCAGTTCCGTTATCAGTT R:GTAAAGTCCGTTACCCCAACCTG	482	Vidal <i>et al.</i> (2004)
<i>hlyA</i>	F:GCATCATCAAGCGTACGTTCC R: AATGAGCCAAGCTGGTTAAGCT	534	Paton y Paton (1998)
<i>lpf</i>	F:CCTTGCGTACTGTCCGTTGA R:AGCGACCAGGGTATTGCTGT	276	Vidal <i>et al.</i> (2007)
<i>saa</i>	F: CGTGATGAACAGGCTATTGC R: ATGGACATGCCTGTGGCAAC	119	Paton y Paton (2002)

F: forward; R: reverse.

### Expresión y análisis de los resultados

Los resultados se colectaron en una tabla de Microsoft Excel®, donde se registraron todas las muestras. Estas muestras fueron catalogadas como positivas o negativas según la presencia de *stx1* y/o *stx2* (perfil toxigénico), y presencia de los cuatro genes de virulencia señalados. Se realizó un análisis estadístico descriptivo, en el cual se expresaron los resultados en porcentaje.

## **Normas de bioseguridad**

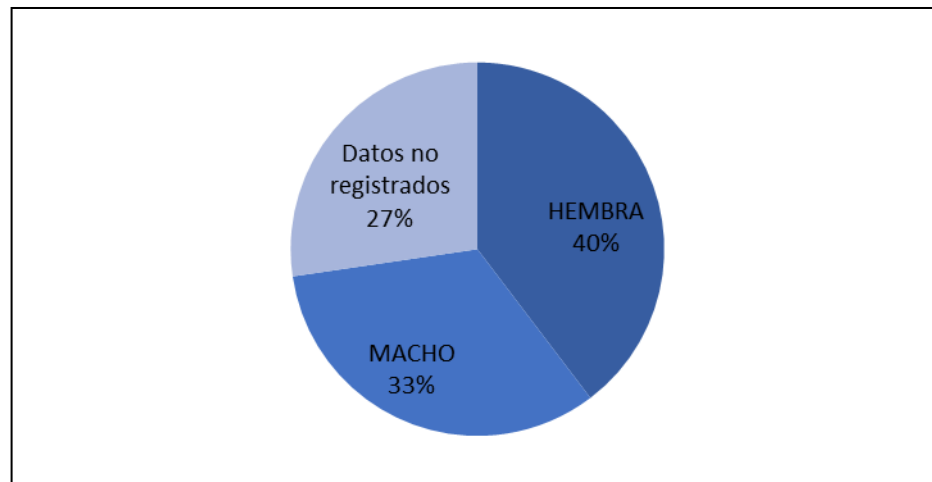
Los procedimientos de laboratorio se realizaron con los estándares de un laboratorio de nivel 2 de bioseguridad, de acuerdo con el Manual de Normas de Bioseguridad de CONICYT (Allende *et al.*, 2008). Entre las medidas de bioseguridad a utilizar se encuentra el uso del delantal dentro del laboratorio, de guantes, desinfectantes, antisépticos, calzado cerrado, y pantalones largos. Los residuos contaminados fueron autoclavados antes de su eliminación.

## RESULTADOS

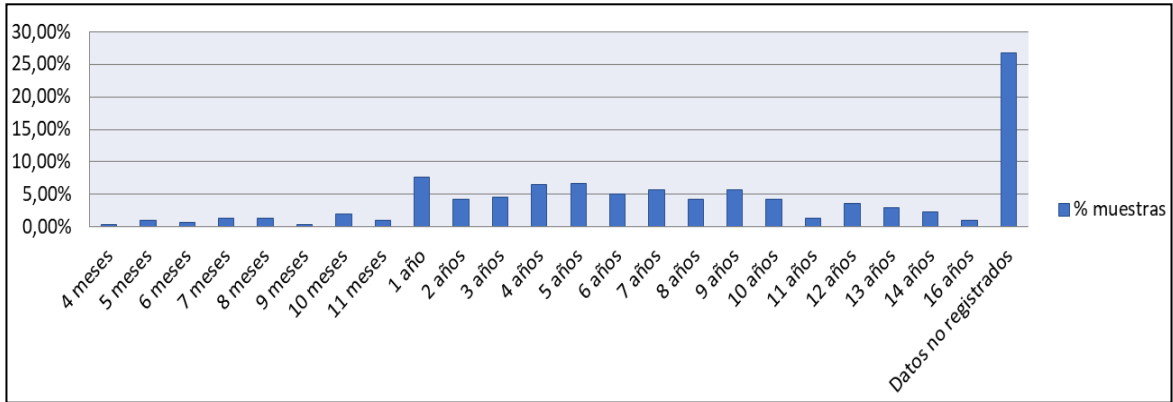
Se recolectó un total de 300 muestras de gatos y 300 de perros, desde clínicas y hospitales veterinarios en las comunas La Pintana, Puente Alto, Providencia, Paine, Renca y Santiago de la Región Metropolitana. Dentro las muestras obtenidas de perros, se obtuvieron los datos del 73,3% de estas, de las cuales la mayoría correspondió a hembras (55%) (Figura 2), y las edades fluctuaron entre los 4 meses y los 16 años (Figura 3). En el caso de los gatos, igualmente se muestrearon más hembras que machos (58%) (Figura 4), lo que represento el 48% de las muestras obtenidas y sus edades se distribuyeron entre los 3 meses y 17 años (Figura 5) representando el 43% de las muestras obtenidas.

Del total de muestras obtenidas se registró desarrollo bacteriano en el 98% de las muestras obtenidas desde perros (Figura 6), y en el 92% de las muestras obtenidas desde gatos (Figura 7).

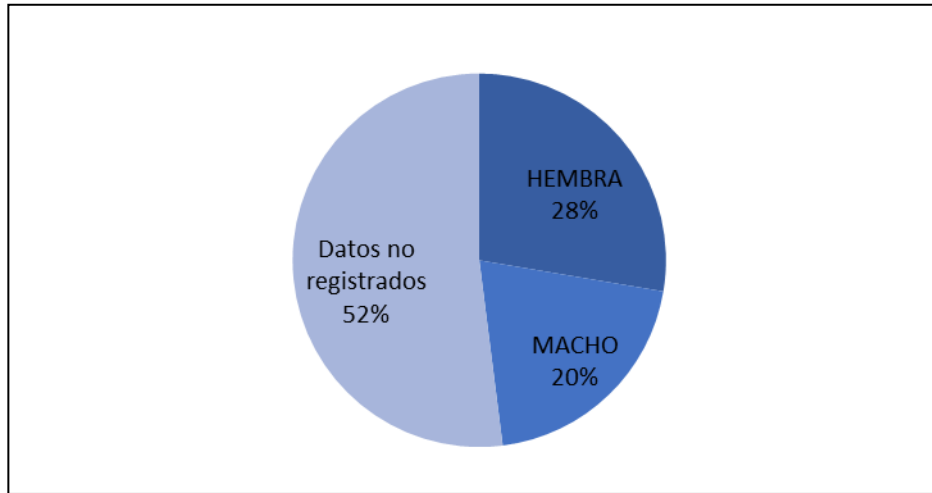
Del total de muestras analizadas, tanto de perros como de gatos, todas resultaron negativas a la presencia de los genes *stx1* y/o *stx2*. Al no contar con muestras positivas a STEC, no se logró determinar la presencia de los demás genes de virulencia (*eae*, *hlyA*, *lpf* y *saa*) en las muestras procesadas.



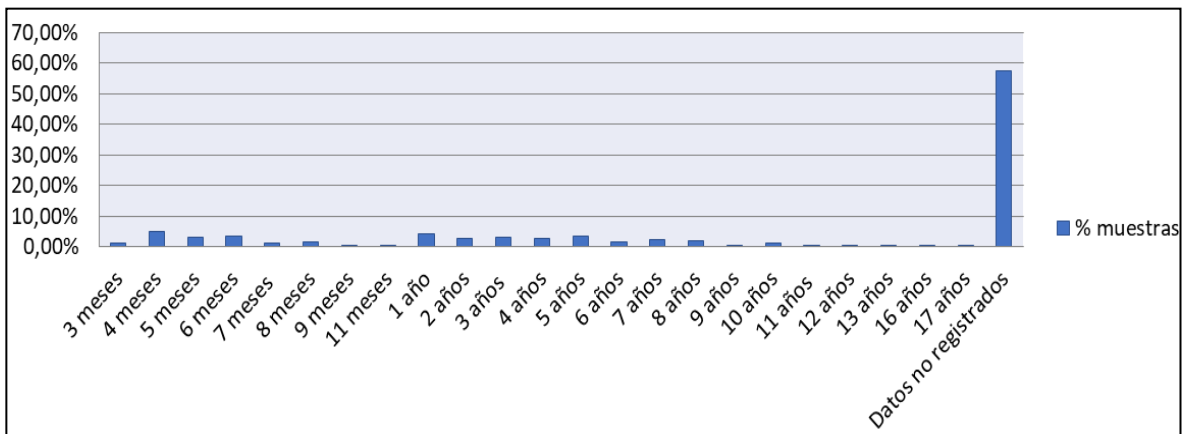
**Figura 2.** Distribución de las muestras obtenidas desde perros según sexo (n=300).



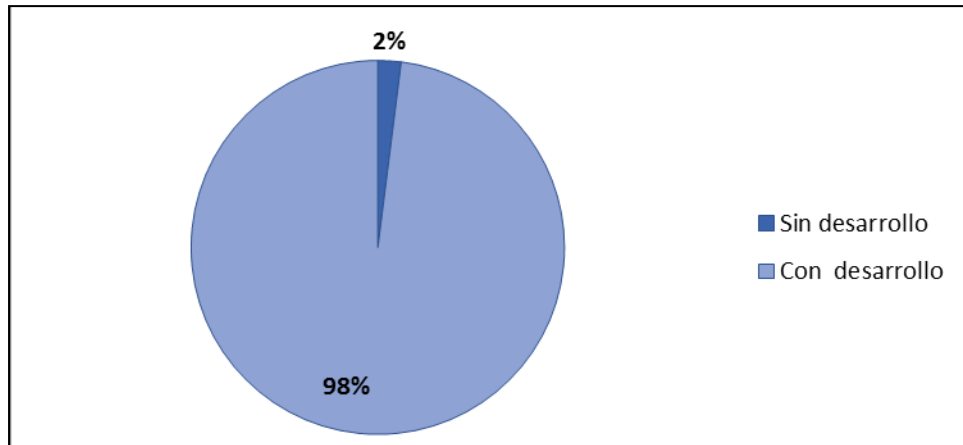
**Figura 3.** Distribución de las muestras obtenidas desde perros según edad (n=300).



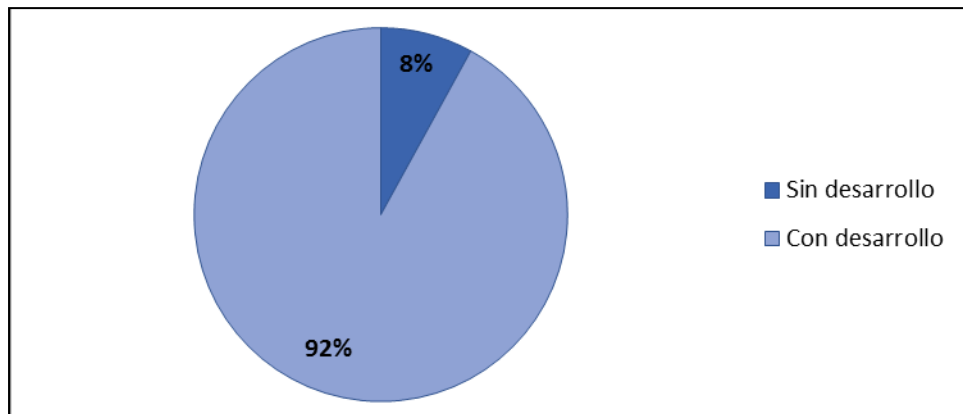
**Figura 4.** Distribución de muestras obtenidas desde gatos según sexo (n=300).



**Figura 5.** Distribución de las muestras obtenidas desde gatos según edad (n=300).



**Figura 6.** Desarrollo bacteriano registrado desde las muestras obtenidas desde perros (n=300).



**Figura 7.** Desarrollo bacteriano registrado desde las muestras obtenidas desde gatos (n=300).

## DISCUSIÓN

Diversos estudios han demostrado la presencia de STEC en mascotas, y más aún, diversos estudios han reportado el aislamiento de cepas de STEC con virulotipos asociados a enfermedad severa en las personas (Busch *et al.*, 2007; Bentancor *et al.*, 2012; Rumi *et al.*, 2012). Estos animales probablemente están expuestos a las mismas fuentes de infección que los humanos (Rumi *et al.*, 2012). En el caso particular de las mascotas, perros y gatos constituyen una importante fuente de exposición para humanos, considerando su contacto frecuente con estas especies, pudiendo presentar STEC en su pelo, piel o bien excretarlo en sus heces (Fernández *et al.* 2006).

En el presente estudio, y con el material y método propuesto, no se logró aislar cepas de STEC, en ninguno de los animales muestreados, y por lo tanto tampoco se realizaron las caracterizaciones propuestas. Considerando prevalencias reportadas a nivel internacional, se esperaba obtener al menos un 1,1% de muestras positivas en perros, y un 2,7% en gatos (Beutin *et al.*, 1993; Gallego *et al.*, 2006; Bentancor *et al.*, 2007; Bentancor *et al.*, 2008). Sin embargo, diversos estudios a nivel internacional también han reportado la ausencia de STEC en perros y gatos mascotas. En este contexto, Fernández *et al.* (2006) en Argentina, muestrearon a 60 perros con y sin diarrea de zonas urbanas que acudieron a consulta veterinaria, y no lograron aislar el patógeno en ninguno de los animales. Los autores atribuyeron sus resultados a los cuidados que presentan los perros de zonas urbanas, como el consumo de alimentos comerciales, caseros cocidos, y acceso a agua potable. De forma similar, Puño-Sarmiento *et al.* (2013) en Brasil, obtuvieron muestras fecales desde 50 perros y 50 gatos con y sin diarrea de un hospital veterinario, para la identificación de STEC. A pesar de registrar desarrollo de colonias de *E. coli*, tampoco lograron identificar cepas de STEC entre dichos aislados. Los autores señalan que estos resultados podían deberse al cuidado y ambiente de los animales, postulando que podría ser más prevalente en animales callejeros o de zonas rurales. Más recientemente, y también en Argentina, Zotta *et al.* (2015) obtuvo muestras fecales de 96 perros y 66 gatos, obteniendo los mismos resultados de los estudios anteriores. Atribuyeron sus resultados al grado de cuidados por parte de los dueños hacia sus mascotas, a partir de la decisión de castración de las mismas,

además que la alimentación brindada era principalmente con alimentos balanceados cuya elaboración implique procesos de cocción.

Debido a que algunas muestras fueron obtenidas de mascotas que asistieron a operativos veterinarios, algunos datos no fueron registrados debido al alto flujo de pacientes durante el muestreo. Además algunos dueños, principalmente de gatos, no conocían la edad de su mascota. Por esto, se obtuvieron los datos en relación al sexo y edad en el 73,3% de los perros muestreados; mientras que en gatos se registró el sexo en el 48% de ellos, y la edad en el 43%. En este estudio se muestrearon animales de ambos sexos sin distinción, y en otros estudios que se han realizado en estos animales, no se ha detectado diferencias estadísticas en la detección de STEC entre machos y hembras (Bentancor *et al.*, 2007). En este estudio los animales muestreados abarcaron distintos rangos de edades, incluyendo cachorros, en los cuales Bentancor *et al.* (2007) y Bentancor *et al.* (2008) describieron la existencia de un mayor riesgo de infección con cepas de STEC cuando la edad es menor de 2 años para perros, y menores de 1 año en gatos. Esto coincide con la etapa en que los animales muestran hábitos de alimentación irregular e ingestión de elementos que no corresponden a su dieta (ramas, plantas, tierra, entre otros). Además, a estos animales con mayor riesgo también se les ha asociado con un mayor riesgo de diseminación del patógeno hacia otros animales y el medio ambiente (Bentancor *et al.*, 2008).

Los resultados obtenidos en esta Memoria de Título pueden deberse a diversas razones. Entre ellas se encuentran la alimentación de los animales muestreados, que en la mayoría es en base a alimento comercial o alimento cocinado, sumado al consumo de agua potable, lo que permitirían reducir el contacto y colonización de estos animales con este microorganismo (Fernández *et al.* 2006).

Otro factor que podría dar cuenta de los resultados registrados es que estos animales habitaban mayoritariamente zonas urbanas, estando sometidos a menos factores de riesgo de adquirir STEC que animales que habitan zonas rurales. Estos últimos están expuestos a factores riesgo, como el contacto con especies consideradas como reservorios, consumo de carne cruda, leche sin pasteurizar, vísceras crudas, aguas estancadas o de bebederos de otros animales de granja, como bovinos y ovinos (Fernández *et al.*, 2006). En el caso particular de los gatos de zonas rurales, la alimentación con carne cruda se encuentra

potenciada por sus hábitos de caza (Bentancor *et al.*, 2008). Es por lo anterior que perros y gatos de zonas rurales pueden actuar como vehículos de cepas de virulentas de STEC de otros animales, y de esta manera transmitir la bacteria a las personas (Trevena *et al.*, 1996).

El nivel de cuidado otorgado por los propietarios también es un factor que puede haber influido en nuestros resultados. En esta memoria, la gran mayoría de las muestras fueron obtenidas desde animales que asistieron a clínicas y/o hospitales veterinarios, lo que refleja que existe una alta preocupación de los dueños por el bienestar y salud de sus mascotas, independiente del nivel socioeconómico de los propietarios. Esto es corroborado por el estudio de Correira (2018), donde señala que, como es esperable, los hogares que más invierten en sus animales son los de niveles socioeconómicos más altos, pero que los niveles socioeconómicos más bajos también invierten en el cuidado de sus mascotas y en sus atenciones de salud.

Otro punto que pudo afectar la detección del agente es la existencia de disbiosis intestinal al momento de la toma de muestras, la que favorecería el crecimiento de una población bacteriana por sobre otra, dificultando así la detección de STEC. La disbiosis intestinal puede tener distintas causas, como tratamientos con antibióticos, procesos inflamatorios intestinales, trastornos metabólicos, alteración en la peristalsis o modificaciones dietarias (Moon *et al.*, 2018). A pesar de que en el consentimiento informado se preguntaba si el animal se encontraba bajo terapia antimicrobiana y que no estuviera con diarrea, esto no se puede descartar.

Otro punto a considerar es que se obtuvo solo una muestra por animal. Estudios han demostrado que existen variaciones en las cepas aisladas en muestreos sucesivos del mismo animal (Padola *et al.*, 2002), o incluso que ya no se aísle STEC (Rumi *et al.*, 2012). Por ello, no se puede descartar este factor, considerando que difícilmente se les puede realizar seguimiento durante distintos días a las mascotas muestreadas.

En cuanto a la sensibilidad y especificidad de las técnicas utilizadas en este estudio, las posibles limitaciones fueron minimizadas mediante el pre-enriquecimiento de las muestras en medios de cultivo líquidos, lo cual permite diluir posibles inhibidores presentes en las deposiciones, y aumentar el número de bacterias presentes en las muestras, lo que permite



una mayor sensibilidad analítica (Paton y Paton, 2002; Bentancor *et al.*, 2007). Así, Bentancor *et al.* (2007) establecieron el límite de detección de STEC en 20 UFC/10 uL de suspensión microbiana, al usar dos fases de cultivo (pre-enriquecimiento y siembra en placa). Por otra parte, los posibles sesgos a nivel de PCR fueron descartados con la utilización de controles positivos y negativos.

Debido a que no se obtuvieron resultados positivos, y existían recursos e insumos disponibles, se incluyeron 52 muestras adicionales obtenidas desde perros de un refugio en la comuna de Curacaví de la Región Metropolitana. Estos animales presentaban condiciones de cuidados e higiene distintas a los antes muestreados, donde podría ser más frecuente el que estuvieran colonizados por STEC, como el alto nivel de hacinamiento en el que vivían, consumo de agua no potabilizada, y los cuidados veterinarios básicos recibidos. Sin embargo, con este número adicional de muestras tampoco se logró aislar el patógeno.

Es importante conocer los niveles de portación intestinal de STEC en perros y gatos mascotas, junto con determinar las características de virulencia de estas cepas, ya que más de la mitad de los hogares en Chile tiene como mascota un perro y/o un gato, los que conviven frecuentemente con niños, siendo estos más susceptibles a desarrollar los cuadros severos de enfermedad producidos por STEC. Aunque en este estudio no se detectó la presencia de STEC en perros y gatos mascotas, no se puede descartar que en otras comunas del país estos animales porten a nivel intestinal este patógeno, por lo que estudios extendidos a nivel nacional serían necesarios para esclarecer esta situación. Por otro lado, sería interesante realizar un estudio donde se muestreen las mascotas de personas afectadas con SHU y CH de casos esporádicos y no asociados a brotes producto de consumo de alimentos contaminados.

## CONCLUSIONES

En el presente estudio, no se logró identificar la presencia de cepas de STEC en deposiciones de perros y gatos mascotas, por lo que no se pudo determinar la presencia de los genes de virulencia *eae*, *hlyA*, *lpf* y *saa*,

Con estos resultados, se puede concluir que los perros y gatos con dueño de algunas comunas de la Región Metropolitana representarían un riesgo bajo para la salud pública nacional referente a la transmisión de cepas de STEC con determinantes de virulencia asociados a colitis hemorrágica y síndrome hemolítico urémico en las personas.

Este estudio contribuye a nivel nacional con información científica actualizada, en un tema donde la información disponible es escasa a nivel nacional e internacional. Además, esta investigación constituye el primer precedente de la situación de STEC en perros y gatos mascotas. Sin embargo, es necesaria la realización de nuevos estudios, que consideren un mayor tamaño muestral, animales de zonas rurales y urbanas para poder comparar los factores de riesgo, y variables epidemiológicas como la edad, sexo, alimentación y contacto con otros animales, y la realización de muestreo seriados. Además, también se sugiere el estudio de las mascotas de pacientes que hayan sufrido alguna enfermedad severa debido a cepas de STEC, para pesquisar la presencia del patógeno en dichos animales.

## BIBLIOGRAFÍA

- ALLENDE, M.; BONO, M.; ECHEVERRÍA, M.; GUILIANI, N.; GYSLING, K.; HANDFORD, M. 2008. Manual de normas de bioseguridad. CONICYT, 2ª ed, Santiago, Chile. CONICYT. pp. 5-34.
- BENTANCOR, A.; RUMI, M.; GENTILINI, M.; SARDOY, C.; IRINO, K.; AGOSTINI, A.; CATALDI, A. 2007. Shiga toxin-producing and attaching and effacing *Escherichia coli* in cats and dogs in a high hemolytic uremic syndrome incidence region in Argentina. FEMS Microbiol Lett. 267(2):251-256.
- BENTANCOR, A.; AGOSTINI, A.; RUMI, M.; DEGREGORIO, O. 2008. Factores de riesgo de infección por cepas de *Escherichia coli* shigatoxigénicas en gatos y perros. InVet. 10(1): 11-18
- BENTANCOR, A.; RUMI, M.; CARBONARI, C.; GERHARDT, E.; LARZÁBAL, M.; VILTE, D.; PISTONE-CREYDT, V.; CHINEN, I.; IBARRA, C.; CATALDI, A.; MERCADO, E. 2012. Profile of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from dogs and cats and genetic relationships with isolates from cattle, meat and humans. Vet Microbiol. 156(3-4):336-342
- BEUTIN, L.; GEIER, D.; STEINRUCK, H.; ZIMMERMANN, S.; SCHEUTZ, F. 1993. Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-like toxin)-producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy domestic animals. J Clin Microbiol. 31(9):2483-2488.
- BEUTIN, L.; MARTIN, A. 2012. Outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) O104:H4 infection in Germany causes a paradigm shift with regard to human pathogenicity of STEC strains. J Food Protec. 75(2):408-418.
- BUSCH, U.; HÖRMANSDORFER, S.; SCHRANNER, S.; HUBER, I.; BOGNER, K. H.; SING, A. 2007. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* excretion by child and her cat. Emerg Infect Dis. 13(2):348.
- CEBULA, T. A.; PAYNE, W. L.; FENG, P. 1995. Simultaneous identification of strains of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and their Shiga-like toxin type by mismatch amplification mutation assay-multiplex PCR. J Clin Microbiol. 33(1): 248-250.
- CORREIRA, C. 2018. Microestudio GfK: Los chilenos y sus mascotas. [en línea] <[https://www.gfk.com/fileadmin/user\\_upload/country\\_one\\_pager/CL/GfK\\_Los\\_chilenos\\_y\\_sus\\_mascotas.pdf](https://www.gfk.com/fileadmin/user_upload/country_one_pager/CL/GfK_Los_chilenos_y_sus_mascotas.pdf)> [consulta: 24- 02-2019]
- CROXEN, M.; LAW, R.; SCHOLZ, R.; KEENEY, K.; WLODARSKA, M.; FINLAY, B. 2013. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev. 26(4):822-840.
- DELL'ORCO, M.; BERTAZZOLO, W.; PAGLIARO, L.; ROCCABIANCA, P.; COMAZZI, S. 2005. Hemolytic-uremic syndrome in a dog. Vet Clin Pathol. 34: 264-269.
- FAGAN, P.; HORNITZKY, M.; BETTELHEIM, K.; DJORDJEVIC, S. 1999. Detection of Shiga-like toxin (*stx1* and *stx2*), intimin (*eaeA*), and enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) hemolysin (EHEC *hlyA*) genes in animal feces by multiplex PCR. Appl Environ Microb. 65(2):868-872.

- **FARFAN, M.; TORRES, A.** 2012. Molecular mechanisms that mediate colonization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains. *Infect Immun.* 80(3):903-913.
- **FERNANDEZ, D.; ETCHEVERRIA, A.; PADOLA, N.; PARMA, A.** 2006. Estudio en caninos de zonas urbanas de Tandil como posibles portadores de *Escherichia coli* verocitotoxigénicos. *InVet.* 2006, 8(1): 111-117.
- **FIGUEROA, A.** 2017. Circular para la vigilancia nacional de Laboratorio para *Escherichia coli* Productor de toxina Shiga (STEC). [en línea] < <http://www.ispch.cl/sites/default/files/documento/2017/07/Circular%20N%C2%B0%2002%20DEL%2014.07.2017%20ISP%20CIRCULAR%20VIGILANCIA%20NACIONAL%20LAB.%20ESCHERICHIA%20COLI%20PRODUCTOR%20TOXINA%20SHIGA%20STEC.pdf> > [consulta: 09- 03-2019]
- **GALLEGO, V.; DEZA, N.; CARBONARI, C.; GUGLIADA, J.; STAMBULIAN, J.; REPETTO, H.** 2006. Detección de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga (STEC) en adultos asintomáticos que conviven con mascotas. In VI Congreso Argentino de la Sociedad Argentina de Infectología. Mar del Plata, Argentina.
- **GYLES, C.** 2007. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. *J Anim Sci.* 85(13)45-82.
- **HORMAZÁBAL, J. C.** 2011. *Escherichia coli* productora de toxina Shiga, escenario en Chile. Chile. [en línea] < [http://www.ispch.cl/sites/default/files/documento/2011/06/110628\\_EColi\\_JCHormazabal.pdf](http://www.ispch.cl/sites/default/files/documento/2011/06/110628_EColi_JCHormazabal.pdf) > [consulta: 04- 04-2018]
- **IBARRA, C.; GOLDSTEIN, J.; SILBERSTEIN, C.; ZOTTA, E.; BELARDO, M.; REPETTO, H.** 2008. Hemolytic uremic syndrome caused by enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Archivos argentinos de pediatría.* 106(5):435-442.
- **INSTITUTO DE SALUD PÚBLICA DE CHILE (ISP).** 2017. Vigilancia de laboratorio de *E. coli* productora de toxina Shiga. Chile. 2010–2016. Boletín Instituto de Salud Pública de Chile. [en línea] < <http://www.ispch.cl/sites/default/files/BoletinSTEC-14082017B.pdf>> [consulta: 04-02-2019]
- **JENKINS, C.; PERRY, N.; CHEASTY, T.; SHAW, D.; FRANKEL, G.; DOUGAN, G.; GUNN, G.; SMITH, H.; PATON, A.; PATON, J.** 2003. Distribution of the *saa* gene in strains of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* of human and bovine origins. *J Clin Microbiol.* 41(4):1775-1778.
- **KAPER, J.; NATARO, J.; MOBLEY, H.** 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol.* 2(2):123-140.
- **KRAUSE, M.; BARTH, H.; SCHMIDT, H.** 2018. Toxins of Locus of Enterocyte Effacement-negative Shiga Toxin-producing *Escherichia coli*. *Toxins.* 10(6):241.
- **MCWILLIAMS, B.; TORRES, A.** 2014. EHEC adhesins. *Microbiol Spectr.* 2(2):3-20
- **MELE C, REMUZZI G, NORIS M.** 2014 Hemolytic uremic syndrome. *Semin Immunopathol* 36:399–420
- **MILIWEBSKY, E.; DEZA, N.; CHINEN, I.; MARTINEZ, E.; GOMEZ, D.; PEDRONI, E.; CAPRILE, L.; BASHCKIER, A.; MANFREDI, E.; LEOTTA, G.; RIVAS, M.** 2007 Prolonged fecal shedding of Shiga toxin-producing

- Escherichia coli* among children attending day-care centers in Argentina. Rev Argent Microbiol 39: 90-92.
- **MOON, C. D., YOUNG, W., MACLEAN, P. H., COOKSON, A. L., & BIRMINGHAM, E. N.** 2018. Metagenomic insights into the roles of Proteobacteria in the gastrointestinal microbiomes of healthy dogs and cats. Microbiolgyopen. 7(5)1-10
  - **NATARO, J.; KAPER, J.** 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev. 11(1):142-201.
  - **PADOLA, N.; SANZ, M.; LUCCHESI, M.; BLANCO, J.; BLANCO, J.; BLANCO, M.; ECHEVERRÍA, A.; ARROYO, G.; PARMA, A.** 2002. First isolation of the enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O145:H- from cattle in feedlot in Argentina. BMC Microbiol 2: 6.
  - **PATON, A.; SRIMANOTE, P; WOODROW, M; PATON, J.** 2001. Characterization of Saa, a novel autoagglutinating adhesin produced by Locus of Enterocyte Effacement-negative Shiga-toxigenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans. Infect Immun. 69(11):6999-7009.
  - **PATON, J.; PATON, A.** 1998. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. Clin Microbiol Rev. 11(3):450-479.
  - **PATON, A.; PATON, J.** 2002. Direct detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by multiplex PCR for *stx1*, *stx2*, *eae*, *ehxA*, and *saa*. J Clin Microbiol. 40(1):271-274.
  - **PUÑO-SARMIENTO J.; MEDEIROS, L.; CHICONI, C.; MARTINS, F.; PELAYO, J.; ROCHA, S.; BLANCO, J.; BLANCO, M.; ZANUTTO, M.; KOBAYASHI, R.; NAKAZATO, G.** 2013. Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from dogs and cats in Brazil. Vet microbiol, 166(3-4):676-680.
  - **RIVAS, M., CHINEN, I.; GUTH, B. E.** 2016. Enterohemorrhagic (Shiga toxin-producing) *Escherichia coli*. In: *Escherichia coli* in the Americas. Springer. Texas, USA. pp. 97-123.
  - **RUMI, M. V., IRINO, K., DEZA, N., HUGUET, M. J.; BENTANCOR, A. B.** 2012. First isolation in Argentina of a highly virulent Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O145:NM from a domestic cat. J Infect Dev Countr. 6(04):358-363.
  - **SCHEUTZ, F.; TEEL, L.; BEUTIN, L.; PIÉRARD, D.; BUVENS, G.; KARCH, H.; STROCKBINE, N.** 2012. Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing Stx nomenclature. J Clin Microbiol 50:2951–2963
  - **SCHÜLLER, S.** 2011. Shiga Toxin interaction with human intestinal epithelium. Toxins. 11(3):626-639.
  - **TORRES, A. G.; GIRON, J. A.; PERNA, N. T.; BURLAND, V.; BLATTNER, F. R.; AVELINO-FLORES, F.; KAPER, J. B.** 2002. Identification and characterization of *lpfABCC'* DE, a fimbrial operon of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. Infect Immun. 70(10):5416-5427.

- **TREVENA, W.; HOOPER, R.; WRAY, C.; WILLSHAW, G.; CHEASTY, T.; DOMINGUE, G.** 1996. Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 associated with companion animals. *Vet Rec.* 138(16):400.
- **VIDAL, R.; VIDAL, M.; LAGOS, R.; LEVINE, M.; PRADO, V.** 2004. Multiplex PCR for diagnosis of enteric infections associated with diarrheagenic *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol.* 42(4):1787-1789.
- **VIDAL, M.; ESCOBAR, P.; PRADO, V.; HORMAZÁBAL, J. C.; VIDAL, R.** 2007. Distribution of putative adhesins in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains isolated from different sources in Chile. *Epidemiol Infect.* 135(4): 688-694.
- **ZAMBRANO, P.; DELUCCHI, A.; CAVAGNARO, F.; HEVIA, P.; ROSATI, M.; LAGOS, E.; NAZAL, V.; GONZÁLEZ, C.; BARRERA, P.; ALVAREZ, E.; PINTO, V.; SALAS, P.; CANO, F.; CONTRERAS, A.; GALANTI, M.; GANA, J.; ZAMORANO, J.; ESPINOZA, A.; DREVES, P.; PEREIRA, J.; BIDEGAIN, A.; PASTEN, E.; YÁÑEZ, L.; CERDA, V.; RODRÍGUEZ, E.; AGLONY, M.; GUTIÉRREZ, E.; SALAS, F.; FIGUEROA, S.; VALENZUELA, M.; GRANDY, J.; GUERRA, B.; LAPADULA, M.; REUTTER, P.; GALLARDO, V.; MALDONADO, D.; AZOCAR, M.; CAVADA, G.** 2008. Síndrome hemolítico urémico en Chile: presentación clínica, evolución y factores pronósticos. *Rev Méd de Chile.* 136(10):1240-1246.
- **ZOTTA, C. M., LAVAYÉN, S., HOLLMANN, P., & LANFRANCONI, V.** 2015. Animales domésticos como reservorio de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga en Mar del Plata. *JSARS.* 6(1): 2-9.

## Anexo 1.



Santiago, a 14 de noviembre de 2017

Certificado n°: 17083-VET-UCH

### CERTIFICADO

El Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA) de la Universidad de Chile, certifica que el protocolo número 14-2017 VETUCH del proyecto de investigación titulado: "Revealing the role of the animal-environment interfase as a reservoir of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains in the Metropolitan Region: Animal and Environmental Health as promoters of national Public Health", cuyo Investigador Responsable es el Dr. Nicolás Galarce Gálvez, del Departamento de Medicina Preventiva Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, no plantea acciones en sus procedimientos que contravengan las normas de Bioética de manejo y cuidado de animales, así mismo la metodología experimental planteada satisface lo estipulado en el Programa Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Chile.

El Investigador se ha comprometido a la ejecución de este proyecto de investigación dentro de las especificaciones señaladas en el protocolo revisado y autorizado por el CICUA, a mantener los procedimientos experimentales planteados y a no realizar ninguna modificación sin previa aprobación por parte de este Comité.

Se otorga la presente certificación para el uso de 300 perros domésticos (*Canis familiaris*) de cualquier raza y 300 gatos domésticos (*Felis silvestris catus*) de cualquier raza para la obtención de muestras rectales. Los animales a muestrear serán animales con dueño que residan en la Región Metropolitana, que concurran a las dependencias de los Hospitales de la Red de Atención Veterinaria de la Universidad por atención médico-veterinaria, desde el 01 de noviembre 2017 al 01 de noviembre de 2018, tiempo estimado de ejecución del proyecto, el cual será financiado por el Proyecto Fondecyt de Iniciación Nro. 11170363.

*El CICUA de la Universidad de Chile, forma parte de la Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo, y está constituido por 43 miembros: 5 médicos veterinarios, 39 académicos (12 de ellos médicos veterinarios), y 9 miembros no asociados a la academia o investigación, y que cuentan con experiencia en bioética relacionada a mantención y uso de animales. El certificado que emite el Comité procede de la aprobación del "Protocolo de Manejo y Cuidado de Animales" después de un estudio acucioso y de la acogida de los investigadores de las observaciones exigidas por el Comité.*

Dr. Cristián Ugaz Ruiz  
Coordinador  
CICUA - VID  
Universidad de Chile



Dr. Emilio Herrera Videla  
Presidente  
CICUA - VID  
Universidad de Chile

Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA)  
Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo (VID) – Universidad de Chile  
www.uchile/cicua.cl email: coordinador.cicua@uchile.cl

## Anexo 2.



### CERTIFICADO N° 103

Santiago, 07, noviembre, 2017

El Comité de Bioseguridad de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, ha revisado el proyecto titulado, "Revealing the role of animal-environment interface as a reservoir of Shiga toxin-producing Escherichia coli strains in Metropolitan Region; Animal and Environmental Health as promoter of National Public Health" que fue adjudicado en el Concurso FONDECYT de Iniciación en la Investigación 2017 con el N°11170363 y cuyo Investigador Responsable es el Dr. Nicolás Galarce., profesional de FAVET.

El proyecto cumple las normas de bioseguridad que se encuentran descritas en el mismo y en el formulario de solicitud de certificados de bioseguridad de FAVET, y que son las adecuadas según las especificaciones contenidas en el "Manual de Bioseguridad en el Laboratorio, de la Organización Mundial de la Salud (versión 2005)" y en el "Manual de Bioseguridad de Conicyt" (versión 2008), que previenen los riesgos para las personas, los animales y el medioambiente.

  
DRA. LISETTE LAPIERRE A.  
Coordinadora  
Comité de Bioseguridad  
FAVET





### Anexo 3.



#### CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA OBTENCIÓN DE MUESTRAS

Yo....., RUT....., expreso de forma voluntaria que estoy de acuerdo en que mi mascota participe en la investigación “Revelando el rol de la interfaz animal-ambiente como reservorio de cepas de *Escherichia coli* productoras de toxina Shiga: Salud Animal y Ambiental como promotoras de la Salud Pública nacional”. Soy consciente de que la participación no incluirá ninguna clase de compensación para mí o para mi mascota, y además he leído o me ha sido leída la información respecto al proyecto, y he tenido la oportunidad de resolver mis dudas al respecto. Por lo anterior, declaro estar en conocimiento de que los procedimientos necesarios para la obtención de muestras desde mi mascota no generarán sufrimiento, y serán utilizadas de forma confidencial para el desarrollo del mencionado proyecto.

Identificación de la mascota:

Nombre:....., especie....., sexo....., edad.....

En Santiago con fecha de.....

Firma Propietario

Sr(a):

Firma Investigador Responsable

Dr. Nicolás Galarce G.