

Detección de genes de virulencia de *Escherichia coli* en crías de alpaca (*Vicugna pacos*) procedentes de La Raya, Cusco, Perú

Detection of *Escherichia coli* virulence genes in baby alpacas (*Vicugna pacos*) from La Raya, Cusco, Peru

Valeria Pérez-Cornejo¹, Danilo Pezo C.^{1*}, Nilton Cárdenas-Suárez², José Becerra-Callo², Miguel Rojas M.³, Alberto Manchego S.³, Juan Suice M.³

RESUMEN

Se analizaron 62 aislados positivos a *Escherichia coli* obtenidos a partir de muestras de heces de crías de alpaca menores de 4 meses de edad, de estas 58 diarreicas y 4 no diarreicas, del Centro de Investigación de Camélidos Sudamericanos (CICAS) La Raya, Universidad San Antonio de Abad de Cusco (UNSAAC), ubicado en la provincia de Canchis, Cusco. El objetivo del estudio fue identificar los genes de virulencia *stx1* y *eaeA* de *E. coli* mediante la técnica de PCR. Los aislados fueron identificados como positivos a *E. coli* mediante el uso de agaros MacConkey y EMB, y pruebas bioquímicas de citrato de Simmons, urea y SIM. Los resultados mostraron que 45.16% (28/62) de los aislados contenían exclusivamente el gen *stx1*, mientras que 9.68% (6/62) presentaba el gen *eaeA*. Además, 37.09% (23/62) de los aislados mostraron la presencia simultánea de ambos genes. Estos hallazgos indican una alta frecuencia de alpacas en los rebaños de la zona de estudio que albergan cepas de *E. coli* con los genes *stx1* y *eaeA*. Estos resultados son consistentes con investigaciones previas realizadas en la región de la sierra del país.

Palabras clave: alpaca, colibacilosis, PCR, *Escherichia coli*, genes de virulencia

¹ Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria, Instituto Veterinario de Investigaciones Tropicales y de Altura - Marangani, Grupo de Investigación PROSAGALs, Cusco, Perú

² Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco - UNSAAC, Institución CICAS, La Raya, Cusco, Perú

³ Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria, Laboratorio de Microbiología y Parasitología Veterinaria, Lima, Perú

* Autor correspondiente: Danilo Pezo C.; spezoc@unmsm.edu.pe

Recibido: 3 de agosto de 2024

Aceptado para publicación: 23 de marzo de 2025

Publicado: 30 de abril de 2025

©Los autores. Este artículo es publicado por la Rev Inv Vet Perú de la Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Este es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la licencia Creative Commons Atribución 4.0 Internacional (CC BY 4.0) [<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.es>] que permite el uso, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que la obra original sea debidamente citada de su fuente original

ABSTRACT

A total of 62 *Escherichia coli* positive isolates were analysed, obtained from faecal samples of alpaca calves less than 4 months old, of which 58 were diarrheal and 4 were non-diarrheic, from the South American Camelid Research Centre (CICAS) La Raya, Universidad San Antonio de Abad de Cusco (UNSAAC), located in the province of Canchis, Cusco. The aim of the study was to identify the *stx1* and *eaeA* virulence genes of *E. coli* by PCR. The isolates were identified as *E. coli* positive by using MacConkey and EMB agars, and biochemical tests of Simmons citrate, urea and SIM. The results showed that 45.16% (28/62) of the isolates contained exclusively the *stx1* gene, while 9.68% (6/62) had the *eaeA* gene. Furthermore, 37.09% (23/62) of the isolates showed the simultaneous presence of both genes. These findings indicate a high frequency of alpacas in the herds of the study area harbouring *E. coli* strains with the *stx1* and *eaeA* genes. These results are consistent with previous research conducted in the mountain region of the country.

Keywords: alpaca, colibacillosis, PCR, *Escherichia coli*, virulence genes

INTRODUCCIÓN

La colibacilosis es una enfermedad infecciosa causada por el bacilo *E. coli* que afecta principalmente a crías de animales de granja (Rodríguez-Ángeles, 2002). Las alpacas neonatas son altamente susceptibles a esta enfermedad debido a las condiciones de manejo en la que se encuentran; es decir, corrales contaminados, pocos lugares para el abrigo, y administración inadecuada de calostro (Weaver *et al.*, 2000; Radostis *et al.*, 2002). La mayor mortalidad en camélidos se da entre el día 2 y 12 de vida, conduciendo a severas pérdidas económicas (Parreño y Marcoppido, 2006). Perú es el país con la mayor población de camélidos sudamericanos, por lo que resulta importante conocer estas características, más aún cuando la actividad alpaquera se concentra en comunidades altoandinas que viven en condiciones de pobreza o extrema pobreza.

Por otra parte, *E. coli* comprende una amplia gama de variantes de virulencias producto de la adquisición de una diversidad de factores de virulencia, en donde las combinaciones más exitosas han generado diversos patotipos (Karper *et al.*, 2004). Cada patotipo tiene un sitio particular de coloniza-

ción en el hospedero, así como diferentes mecanismos de virulencia, signos clínicos y consecuencias. La codificación de factores de virulencia está a cargo de diferentes genes, cuya identificación es de gran importancia para el diagnóstico, diseño de herramientas y tratamientos orientados a enfrentar la enfermedad, hacer vigilancia epidemiológica y comprender los mecanismos de patogenicidad de *E. coli*. Las investigaciones realizadas en Perú reportan alpacas que albergan los patotipos EPEC, debido a la presencia de los genes *eae* y *bfp*, y STEC, por la presencia de los genes *stx* y *eae*, tanto en animales diarreicos como no diarreicos (Luna *et al.*, 2012; Silvera *et al.*, 2012; Mori *et al.*, 2014; Siuce *et al.*, 2020).

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron 62 aislados de *E. coli* provenientes de heces diarreicas (58 diarreicas y 4 no diarreicas) de alpacas menores de 4 meses del Centro de Investigación de Camélidos Sudamericanas (CICAS) de la Universidad San Antonio de Abad de Cusco (UNSAAC) en la Raya, ubicado a 4338 msnm, recolectados durante febrero y abril de 2023. Los aislados fueron identificados

Cuadro 1. Cebadores para los genes *stx* y *eaeA*

Marcador genético	Cebador	Estructura	Producto (bp)	Referencias
<i>stxI</i>	StxForw	GAGCGAAATAATTATATGTG	518	Mohammadzadeh <i>et al.</i> , 2017
	StxRev	TGATGATGGCAATTCAGTAT		
<i>eaeA</i>	Sk1Forw	GTAAAGTCCGTTACCCCAACCTG	881	Lopes <i>et al.</i> , 2018
	Sk2Rev	CAAAGCGCACAAAGACTACCA		

Cuadro 2. Genes identificados mediante la PCR para *stxI* y *eaeA*

Genes detectados	Origen de los 62 aislados de <i>E. coli</i>					
	Heces diarreicas		Heces no diarreicas		Total	
	n	%	n	%	n	%
<i>stxI</i>	25	43.10	3	75.0	28	45.16
<i>eaeA</i>	6	10.34	0	0	6	9.68
<i>stxI</i> + <i>eaeA</i>	22	37.93	1	25.0	23	37.09
Ninguno	5	8.62	0	0	5	8.06
Total	58	100.0	4	100.0	2	100.0

como positivos a *E. coli* mediante aislamiento bacteriológico con agar MacConkey y EMB, y las pruebas bioquímicas de citrato de Simmons, urea y SIM.

Los aislados fueron sometidos a extracción de ADN mediante el uso del kit comercial Wizard® Genomic DNA Purification (Promega, 2023), con la finalidad de identificar los genes de virulencia *stxI* y *eaeA* mediante la técnica de PCR. Se emplearon cebadores específicos (Cuadro 1), validados en estudios anteriores, asegurando así una amplificación específica de los genes de interés (Makino *et al.*, 2003; Aranda *et al.*, 2008; Lopes *et al.*, 2008; Medina *et al.*, 2010; Mohammadzadeh *et al.*, 2016; Da Cruz Rocha *et al.*, 2017, Cardona-López *et al.*, 2021). Los controles positivos fueron el ADN de muestras de campo que previamente han sido

positivos a los cebadores referenciados del presente trabajo.

La mezcla para la PCR de *stxI* estuvo formada por 6.5 µl de agua libre de nucleasas, 12.5 µl de MasterMix, 0.5 µl de sus cebadores y 5 µl de ADN. Se inicia con un ciclo de 95 °C por 1 min, seguido por 40 ciclos de 94 °C durante 1 min, 44 °C por 1 min y 72 °C por 1 min, continuando con un ciclo de 72 °C por 5 min y finalmente 4 °C hasta el infinito. Para *eaeA* se utilizó 6.5 µl de agua libre de nucleasas, 12.5 µl de MasterMix, 0.5 µl de sus cebadores, y 5 µl de ADN. La reacción inicia con un ciclo de 95 °C por 5 min, 35 ciclos de 40 s a 94 °C, 52 °C durante 1 min, 72 °C durante 1 min y 50 s, seguido por un ciclo de 72 °C por 7 min, y finalmente 4 °C hasta el infinito. Para la lectura de resultados, se empleó gel de agarosa a 1.5%.

RESULTADOS

Los resultados de la PCR indicaron que 45.16% (28/62) y 9.68% (6/62) de los aislados presentaron exclusivamente los genes *stx1* (Figura 1) y *eaeA* (Figura 2), respectivamente (Cuadro 2). Asimismo, 37.09% (23/62) contenían los genes *stx1* y *eaeA* de forma simultánea (Cuadro 2).

DISCUSIÓN

Cuatro de los 62 aislados positivos de *E. coli* provenían de muestras no diarreicas. Estos aislados contenían los genes de virulencia *stx1*, ya sea solos o en combinación con *eaeA*. La diarrea neonatal es una enfermedad de etiología múltiple e influenciada por diversos factores, incluyendo factores ambientales, nutricionales y de manejo (Allasia *et al.*, 2019). Además, la ingesta de calostro es crucial para la inmunidad de los animales contra enfermedades infecciosas (Aquad *et al.*, 2020). En este contexto, la detección de los genes de virulencia de *E. coli*, *stx1* y *eaeA*, en alpacas sin diarrea podría indicar un sistema inmunológico capaz de reconocer y combatir la infección de manera efectiva. Por otro lado, la identificación de estos animales asintomáticos es muy importante, ya que representan un riesgo debido al contacto de sus heces con el resto del rebaño (Rivas-Ruiz *et al.*, 2020).

Se encontró que 28 de los 62 aislados (45.16%) fueron positivos únicamente para el gen *stx1*, de los cuales 25 provenían de muestras diarreicas. Los genes *stx* codifican la toxina Shiga, que es el principal factor de virulencia del STEC y puede causar desde cuadros diarreicos leves hasta colitis hemorrágica (Hannaoui *et al.*, 2009). Las toxinas Shiga se dividen en dos tipos, *stx1* y *stx2*, codificadas por los genes con los mismos nombres. La toxina *stx1*, en particular, suele provocar una enfermedad más leve y contribuye a la patogenia del EHEC en terneros al suprimir la respuesta inmune asocia-

da a la mucosa (Menge *et al.*, 1999; Melton Celsa, 2014). Por lo tanto, la presencia del gen *stx1* en la mayoría de los aislados de heces diarreicas destaca su capacidad patógena para causar diarrea. No obstante, sería necesario evaluar la presencia del gen *stx2* para determinar si este gen también ha contribuido a los cuadros diarreicos. La predominancia del gen *stx* en los aislados de *E. coli* provenientes de alpacas jóvenes hallada en esta investigación coincide con estudios previos (Cid *et al.*, 2011; Silvera *et al.*, 2012).

De los 62 aislados, 6 fueron positivos a *eaeA*, los cuales provenían de heces diarreicas en su totalidad. Este gen se encarga de la codificación de la intimina, factor de virulencia característico de EPEC y causante de la lesión de adherencia y borrado (Donnenberg *et al.*, 1993). El hallazgo exclusivo de este gen en muestras con diarrea subraya su notable capacidad para causar cuadros diarreicos (Luna *et al.*, 2012; Siuce *et al.*, 2020). Por otro lado, estos resultados contrastan con un estudio anterior donde el gen *eaeA* predominaba en heces no diarreicas (Mori *et al.*, 2014). Esta discrepancia podría deberse a las diferencias en la edad de los animales examinados. En el estudio citado, se analizaron aislados de animales mayores de 60 días, mientras que en la presente investigación se incluyeron muestras de animales menores de 4 meses de edad. Estos últimos son más propensos a experimentar cuadros diarreicos, a diferencia de los animales de mayor edad (Bardiau *et al.*, 2010).

Los genes *stx1* y *eaeA* fueron detectados simultáneamente en 22 de los 62 aislados positivos a *E. coli* provenientes de heces diarreicas. En contraste, solo se encontró un aislado positivo para ambos genes en muestras no diarreicas. La alta prevalencia de aislados positivos para *eaeA* entre aquellos que también son positivos para *stx1* sugiere el papel del gen *eaeA* en la colonización intestinal por STEC, cuyo principal factor de virulencia es la toxina Shiga (Sandhu *et al.*, 1995; Gyles, 2007). Estudios previos han reportado la presencia de ambos genes en ais-

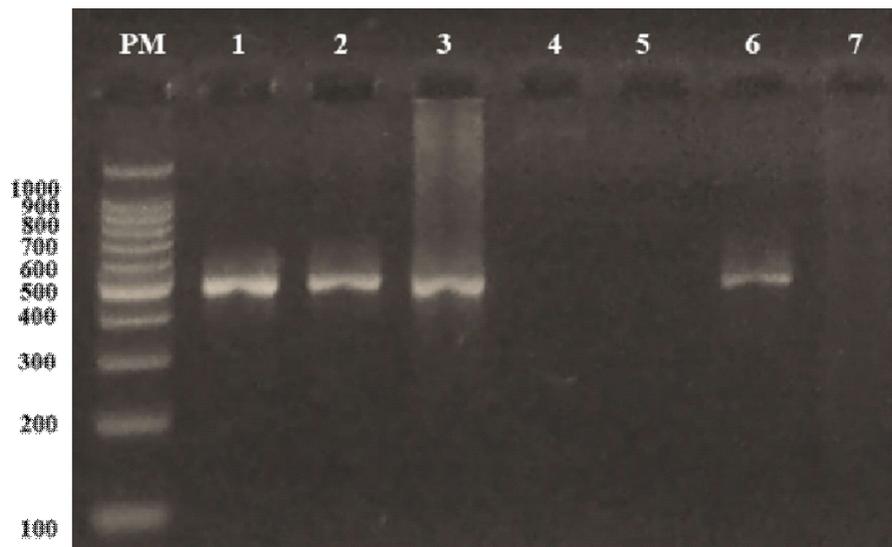


Figura 1. PCR para detección del gen *stxI*. El pocillo 5 corresponde al control negativo o blanco. Los pocillos 1, 2, 3 y 6 indican productos positivos para el gen *stxI* (518 bp). Ladder de 100 bp. PM: Peso molecular; bp: Pares de base

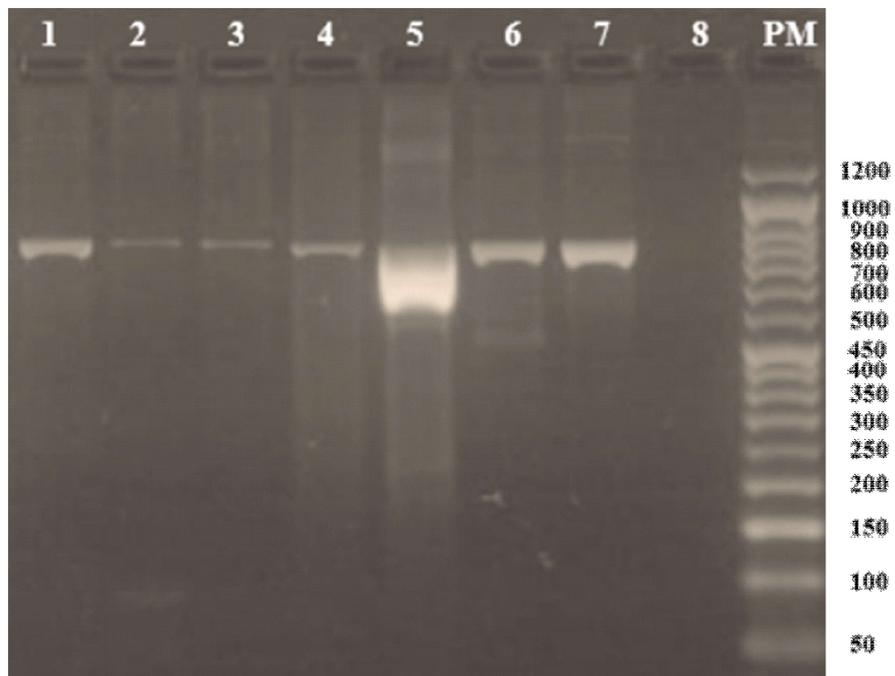


Figura 2. PCR para detección del gen *eaeA*. El pocillo 8 contiene el control negativo. Los pocillos 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 contienen los productos positivos para el gen *eaeA* (881 bp). Ladder de 50 bp. PM: Peso molecular, bp: Pares de base

lados de heces diarreicas de alpacas y un guanaco en la región de la Patagonia (Silvera *et al.*, 2012; Mercado *et al.*, 2004). Además, *stx1* y *eaeA* han sido previamente reportados en terneros, cerdos y niños (Rivera *et al.*, 2012; Yacarini-Martínez *et al.*, 2019). Es importante destacar que la presencia de los genes *stx* y *eaeA* se asocia con cuadros diarreicos más graves (Oderiz *et al.*, 2018).

CONCLUSIONES

En la población de crías de alpaca del CICAS, en la comunidad de La Raya, Cusco, se observa una alta frecuencia de *E. coli* que contiene el gen *stx1*, seguido por la presencia del gen *eaeA*.

LITERATURA CITADA

1. **Allassia M, Angeli E, Machado S, Duarte S, Lapalma C, Schlegel S, Trucco A, et al. 2019.** Diarrea neonatal: una enfermedad multifactorial – resultados preliminares en Rotavirus y Coronavirus. En: VII Jornada de Difusión de la Investigación y Extensión. Esperanza, Argentina.
2. **Aranda K, Fabbricotti S, Fagundes-Neto U, Scaletsky I. 2008.** Single multiplex assay to identify simultaneously enteropathogenic, enteroaggregative, enterotoxigenic, enteroinvasive and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains in Brazilian children. FEMS Microbiol Lett 267: 145-150. doi: 10.1111/j.1574-6968.2006.00580.x
3. **Auad J, Cerutti J, Cooper LG, Aguilar MS, Lozano A. 2020.** Dinámica de la transferencia de inmunoglobulina G en el binomio madre-cría de llamas (*Lama glama*). Revista Veterinaria 31: 78-81.
4. **Bardiau M, Grégoire F, Muylaert A, Nahayo A, Duprez JN, Mainil J, Linden A. 2010.** Enteropathogenic (EPEC), enterohaemorrhagic (EHEC) and verotoxigenic (VTEC) *Escherichia coli* in wild cervids. J Appl Microbiol 109: 2214-2222. doi: 10.1111/j.1365-2672.2010.04855.x
5. **Cardona-López MA, Padilla-Frausto JJ, Madriz-Elisondo AL, Hinojosa-Dávalos J, Navarro-Villaruel CL, Varela-Hernández, Ibarra-Velázquez LM. 2020.** Identificación de patotipos de *Escherichia coli* en carne molida de expendios de Guadalajara, Jalisco, México. Rev Bio Cienc 7: E924
6. **Cid D, Martín-Espada C, Maturrano L, García A, Luna L, Rosadio R. 2011.** Diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from neonatal Peruvian alpacas (*Vicugna pacos*) with diarrhea. En: V Simposio Europeo sobre Camélidos y otras Fibras. Sevilla, España.
7. **Da Cruz Rocha D, Do Rosario A, Dias S, Brito E. 2017.** Caracterización molecular de *Escherichia coli* enteropatógena atípica (EPEC) en animales silvestres capturados en la Región Amazónica. Rev Panamazonica Saude 8: 9-16
8. **Donnenberg MS, Tzipori S, McKee ML, O'Brien AD, Alroy J, Karper JB. 1993.** The role of the *eae* gene of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in intimate attachment *in vitro* and in a porcine model. J Clin Invest 92: 1418-1424. doi: 10.1172/JCI116718
9. **Gyles C. 2007.** Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. J Anim Sci 85 (Suppl): E45-E62.
10. **Hannaoui Rodríguez E, Villalobos L, Martínez R. 2009.** *Escherichia coli* shigatoxigénica: Patogénesis, diagnóstico y tratamiento. Rev Soc Ven Microbiol 29: 13-20.
11. **Karper JB, Nataro JP, Mobbley HL. 2004.** Pathogenic *Escherichia coli*. Nat Rev Microbiol 2: 123-140.
12. **Lopes E, Maciel W, Medeiros P, Bona M, Bindá A, Lima S, Gaio F, Teixeira R. 2018.** Molecular diagnosis of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from Psittaciformes of illegal wildlife trade. Pesqui Vet Brasil 38: 762-766. doi: 10.1590/1678-5150-PVB-5083

13. **Luna L, Maturrano L, Rivera H, Zanabria V, Rosadio R. 2012.** Genotipificación, evaluación toxígena in vitro y sensibilidad a antibióticos de cepas de *Escherichia coli* aisladas de casos diarreicos y fatales en alpacas neonatas. *Rev Inv Vet Perú* 23: 280-288. doi: 10.15381/rivep.v23i3.910
14. **Makino S, Tobe T, Asakura H, Watarai M, Ikeda T, Takeshi K, Sasakawa C. 2003.** Distribution of the secondary type III secretion system locus found in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 isolates among Shiga toxin-producing *E. coli* strains. *J Clin Microbiol* 41: 2341-2347. doi: 10.1128/JCM.41.6.-2341-2347.2003
15. **Medina G, Esquivel P, Lifschitz V, Medina L, Myriam, Silvina L, Merino L. 2010.** Detección de *Escherichia coli* diarreogénicos en niños de barrios humildes de Corrientes, Argentina. *Rev Cubana Med Trop* 62: 56-65
16. **Melton-Celsa AR. 2014.** Shiga Toxin (Stx) classification, structure, and function. *Microbiol Spectr* 2: EHEC-0024-2013. doi: 10.1128/microbiolspec.-EHEC-0024-2013
17. **Menge C, Wieler LH, Schlapp T, Baljer G. 1999.** Shiga toxin 1 from *Escherichia coli* blocks activation and proliferation of bovine lymphocyte subpopulations *in vitro*. *Infect Immun* 67: 2209-2217.
18. **Mercado EC, Rodríguez SM, Elizondo AM, Marcopido G, Parreño V. 2004.** Isolation of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* from a South American Camelid (*Lama guanicoe*) with Diarrhea. *J Clin Microbiol* 42: 4809-4811. doi: 10.1128/jcm.42.10.4809-4811.2004
19. **Mohammadzadeh M, Tavakoli M, Yaslianifard S, Asadi E, Golmohammadi R, Mirnejad R. 2019.** Genetic diversity and antibiotic susceptibility of uropathogenic *Escherichia coli* isolates from kidney transplant recipients. *Infect Drug Resist* 9: 1795-1803. doi: 10.2147/IDR.S200811
20. **Mori L, Perales R, Rodríguez J, Shiva C, Koga Y, Choquehuanca G, Palacios C. 2014.** Molecular identification of shiga-toxin producing and enteropathogenic *Escherichia coli* (STEC and EPEC) in diarrheic and healthy young alpacas. *Adv Microbiol* 4: 360-364. doi: 10.4236/aim.2014.47043
21. **Oderiz S, Leotta GA, Galli L. 2018.** Detección y caracterización de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga en niños atendidos en un hospital pediátrico interzonal de la ciudad de La Plata. *Rev Argent Microbiol* 50: 341-350. doi: 10.1016/j.ram.2017.08.008
22. **Parreño V, Marcopido G. 2006.** Estudio de la sanidad en camélidos: avances a partir de la obtención de muestras de camélidos silvestres. En: Vilá B (ed). *Investigación, conservación y manejo de vicuñas*. Argentina: Universidad de Luján. p 147-164.
23. **Radostis OM, Gay CC, Blood DC, Hinchcliff KW. 2002.** Medicina veterinaria. Tratado sobre las enfermedades del ganado bovino, ovino, porcino, caprine y equino Vol 1. 9ª ed. Madrid: McGraw-Hill: p 923-924.
24. **Rivas-Ruiz CM, Cantú-Soto EU, Maldonado-Mendoza IE, Figueroa-López AM, Anduro-Jordan JA, Luna-Nevarez P, López-Castro PA. 2020.** Detección de *Escherichia coli* productora de toxina-Shiga en bovinos asintomáticos del sur de Sonora, México. *Ecosist Recur Agropec* 7: e2240. doi: 10.19136/era.a7n2.2240
25. **Rivera FP, Sotelo E, Morales I, Menacho F, Medina AM, Evaristo R, Valencia R, et al. 2012.** Short communication: Detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in healthy cattle and pigs in Lima, Peru. *J Dairy Sci* 95: 1166-1169. doi: 10.3168/jds.2011-4662
26. **Rodríguez-Ángeles G. 2002.** Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Pública Mex* 44: 464-475.

27. **Sandhu KS, Clarke RC, McFadden K, Brouwer A, Louie M, Wilson J, Lior H, Gyles CL. 1996.** Prevalence of the *beaeA* gene in verotoxigenic *Escherichia coli* strains from dairy cattle in Southwest Ontario. *Epidemiol Infect* 116: 1-7. doi: 10.1017/s095026880005888x
28. **Silvera E, Perales E, Rodríguez J, López T, Gavidia C, Agapito J, Palacios C. 2012.** Presencia de *Escherichia coli* O157 en crías de alpacas (*Vicugna pacos*). *Rev Inv Vet Perú* 23: 98-104.
29. **Siuce J, Maturrano L, Wheeler J, Rosadio R. 2020.** Diarrheogenic *Escherichia coli* isolates from neonatal alpacas mainly display F17 fimbriae adhesion gene. *Trop Anim Health Pro* 52: 3917-3921. doi: 10.1007/s11250-020-02415-2
30. **Weaver D, Tyler J, Scott M, Wallace L, Marion E, Holle J. 2000.** Passive transfer of calostrual immunoglobulin G in neonatal llamas and alpacas. *Am J Vet Res* 61: 738-741. doi: 10.2460/ajvr.2000.-61.738
31. **Yacarini-Martínez A. 2019.** Genes de virulencia de *Escherichia coli* detectados en muestras diarreicas de niños de la Región Lambayeque-Perú. *Horiz Med* 19: 7-12. doi: 10.24265/horizmed.2019.-v19n1.02