

# Estudio del potencial de dispersión de *Escherichia coli* O157:H7 en áreas de producción agropecuaria del Valle del Yaqui, Sonora, México

Cantú Soto, U.E.<sup>1\*</sup> • Meza Vizcarra, V.A.<sup>1</sup> • Chávez Almanza, A.F.<sup>1</sup>  
Ruvalcaba Velázquez, M.<sup>2+</sup> • Figueroa López, A.M.<sup>1</sup> • Alcalá Rosas R.I.<sup>1</sup>

*Palabras clave:* aire/partícula suspendida, STEC, cPCR  
*Key words:* air/suspended particle, STEC, cPCR

## Introducción

*Escherichia coli* productora de toxina Shiga (STEC) es un importante agente causal de diarrea y la principal causa de Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) post diarreico. STEC pertenece a un grupo de patógenos zoonóticos emergentes, caracterizado por poseer dentro de su genoma los genes *stx1* y *stx2*, responsables de codificar para dos potentes verocitotoxinas llamadas toxina Shiga 1 (Stx1) y toxina Shiga 2 (Stx2), las cuales son reconocidas como su principal factor de patogenicidad [1].

Tanto el serotipo O157:H7 como los serogrupos no-O157 son patógenos reconocidos de transmisión alimentaria, con un aumento de reportes de infecciones por STEC no-O157 [2]. El SUH es causado en mu-

chos de los casos por cepas STEC, principalmente por *E. coli* O157:H7, y se caracteriza por anemia microangiopática, trombocitopenia e insuficiencia renal. La asociación entre SUH y toxina Shiga es la causa de 90% de casos de este padecimiento entre niños [3].

El bovino, se ha identificado como el principal portador asintomático de la STEC O157:H7, y son considerados como el principal reservorio y súper propagadores de este serotipo [4]. Acorde al Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP-SADER), México cría y exporta al año en promedio 1,046,219 bovinos en pie a los Estados Unidos de América. El estado de Chihuahua es el exportador principal y Sonora ocupa el segundo lugar; en el primer trimestre

1 Departamento de Biotecnología y Ciencias Alimentarias. Instituto Tecnológico de Sonora. Calle 5 de febrero 818 sur Col. Centro, cp. 85000, Cd. Obregón Sonora, México.

2 Bioera México. Naciones Unidas 5414, oficina 4, cp.45110, Jardines Vallarta, Zapopan, Jalisco, México.

\* ernesto.cantu@itson.edu.mx

+ marcos.ruvalcaba@bioera.com.mx



del 2022, Sonora exportó 55,592 becerros (53,712) y vaquillas (1,880) en pie. Esta condición de productor de bovino en pie con fines de exportación pone de relieve la importancia de realizar monitoreo ambiental respecto al movimiento post-excreción en el aire de STEC.

Un estudio previo realizado por el equipo de trabajo del Laboratorio de Investigación en Microbiología del Instituto Tecnológico de Sonora (ITSON) estableció el primer reporte de la presencia de STEC O157:H7 en heces de bovinos asintomáticos en el Noroeste de México; en el estudio desarrollado en el año 2018, se encontró que la incidencia de la STEC O157:H7 fue del 3.1% y de STEC no O157 de 19.8%. Estos resultados sugieren que el ganado bovino es un reservorio primario de STEC en esta región del país y se sugirió avanzar en el estudio de las heces de bovinos como vector importante de contaminación hacia otras matrices [5].

El grupo de trabajo coincide en que, el uso del estado del arte de herramientas de tipo molecular será lo que coadyuve a mantener la pertinencia hacia la iniciativa privada y hacia la sociedad. En ese contexto, y bajo un convenio de colaboración Bioera México – ITSON se incorporó el uso de la PCR por convección (cPCR), la cual es una tecnología novedosa que incluye el uso de tres placas de calentamiento para la desnaturalización, anillamiento y polimerización para generar la convección en los tubos de PCR; el método no requiere rampas entre temperaturas como ocurre en los termocicladores tradicionales, y por ello el tiempo de reacción es drásticamente reducido.

Es importante también resaltar que, el grupo de trabajo transita hacia el uso de ensayos de flujo lateral de ácidos nucleicos (NALF), el cual es un método reciente desarrollo para la detección de patógenos de interés en alimentos; básicamente es una detección indirecta de los productos de PCR amplificados a través del uso de anticuerpos contra oligos específicos etiquetados con Carboxy-fluoresceína (FAM), digoxigenina (DIG) y biotina, lo cual permite ir dejando en uso reducido el gel de agarosa y fluoróforos intercalantes de alta toxicidad como el bromuro de etidio.

Los resultados que presentamos en este trabajo permiten avanzar en la identificación de la STEC O157:H7 como un potencial contaminante, a través

del aire, de matrices agroalimentarias en esta región de México.

Así mismo, como parte de las aportaciones relevantes, el grupo de trabajo universidad – empresa plantea, a manera de debate, para posteriores estudios lo siguiente: el uso y aplicación de estas técnicas de cPCR y NALF en campo, atendiendo la necesidad en el lugar donde se encuentre “*in situ*”, lo que las nuevas tendencias definen como POCT (Point Of Care Testing). Se dejara sobre la mesa la posibilidad y deseo de desarrollar nuevos trabajos en el futuro cercano que nos brinden la oportunidad de generar nuevas conclusiones que nos acerquen a ser de los pioneros en México, en la implementación y desarrollo de procedimientos que permitan integrar estas nuevas tecnologías en los protocolos estándar de laboratorios de diagnóstico público y privado; constituyéndose como un análisis tipo tamizaje que permite tomar una decisión rápida en campo, pero que al mismo tiempo permita cotejar de manera tradicional en laboratorio, ya que al usar solo un 10% del producto de PCR del ensayo para revelar el resultado por NALF, el resto puede integrarse en una cadena de custodia y de frío que demande cualquier sistema de calidad con marco de referencia nacional y/o internacional.

Finalmente, señalar que se aspira a contribuir en México, con la actualización de las Normas de diagnóstico animal, así como para la identificación de organismos patógenos zoonóticos; para ello el grupo de trabajo está preparándose para documentar lo necesario en la evolución del diagnóstico molecular en el país.

El objetivo del estudio fue establecer un piloto sobre el potencial de dispersión de *E. coli* O157:H7 en áreas de crianza de bovinos en el sur de Sonora, mediante el estudio de aire/partículas suspendidas con aislamiento en agar selectivo y empleando cPCR e inmunoensayos NALF

## Metodología

El muestreo de aire/partícula suspendida se realizó durante el primer semestre del año 2022 en dos sitios de crianza de bovino; uno a escala de producción micro para consumo local (sitio 1) y otro con fines de macro producción para exportación (sitio 2). Para el sitio 1 la dirección del viento fue de norte a sur, mien-

tras que para el sitio 2 de este a oeste; utilizando el sistema CESAVE – SIAFESON ([www.siafeson.com/remas](http://www.siafeson.com/remas)) se verificó que en los días de colecta de muestra la velocidad del viento fuera mayor a 10km/h.

Para el muestreo de aire/partícula suspendida se utilizó el equipo aspirador de aire SAS super 100® colocado por el operador a una altura de 1.5 m, conteniendo en el cabezal una placa de contacto con agar cromogénico Rainbow® O157. En cada sitio de muestreo se marcaron sitios a 0, 50 y 100 metros a partir del cerco perimetral de la granja de bovinos y se colectaron muestras simples a las 0, 6 y 24 horas para un total de 36 muestras. Utilizando el SAS super 100® se aspiró un volumen de 1 m<sup>3</sup> de aire y posteriormente, entre cada muestreo, la caja se retiraba del cabezal y la tapa y compartimiento para la placa de contacto se desinfectaba con solución de alcohol etílico al 70%, y la placa se resguardó en una bolsa estéril para después ser transportadas en refrigeración; una vez en el Laboratorio se colocaron a temperatura ambiente y se incubaron a 37°C ± 1°C de 18 a 24 h. De cada placa de agar cromogénico Rainbow® O157 se seleccionaron el total de las colonias que presentaban coloración negras, grises, púrpuras-azules y se sembraron en agar de tripticasa de soya (TSA) (Cat. 236950, BD®), incubadas a 37°C ± 1°C por 18 h, se verificó mediante tinción Gram que la morfología de los aislados correspondiera a la característica de *E. coli* (bacilo corto Gram negativo) y finalmente se preservaron a -70°C en caldo de tripticasa de soya (TSB) (Cat. 211825, BD®) con 20% de glicerol hasta su análisis.

Para la extracción de ADN del control positivo (cepa O157:H7-CIBNOR) y de las cepas aisladas a partir de aire/partícula suspendida, se utilizó un extractor portátil de ácidos nucleicos (Palm Tron® E1, Ahram BIOSYSTEM) con batería de Li Polímero, siguiendo la metodología del fabricante que consiste en mezclar 200 µL de *buffer* Quick DE con 20 µL de muestra (cepa incubada en TSB a 35°C/18 h); posteriormente se toman 5 µL de la mezcla y se depositan en un tubo DE PALM PCR™ con 20 µL de reactivo DE, se centrifugó por 1 minuto a 8500 rpm en una centrifuga Ahram® RX1, BIOSYSTEM, para después colocar los tubos en el equipo Palm Tron® E1 por 6 minutos y finalmente centrifugar por 1 minuto a 8500 rpm, tomando 5 µL del sobrenadante para la PCR; el

resto de la extracción se mantuvo en almacenamiento a -20°C. La concentración y pureza del ADN fue determinada utilizando un espectrofotómetro Nano-Drop 2000c (Thermo Scientific®); la integridad y la especificidad de los oligonucleótidos se verificaron mediante gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (0.33 mg/mL), visualizándolo con un sistema Minibis Pro DNR (sistemas Bio-Imaging®).

La cPCR se desarrolló en 20 µL de volumen de reacción, conteniendo: 5X PalmTaq® Express Master Mix (5X) (suplementada con 2.5 nM de MgCl<sub>2</sub> y 0.2 mM dNTPs, 0.8 U *Taq high-speed DNA polymerase*) (Ahram Biosystems®) y 10 µM de cada oligonucleótido. Para la detección de *Escherichia coli* O157:H7 y verificar la especificidad de la reacción se utilizó el inmunoensayo NALF2 (*Nucleic Acid Lateral Flow*) doble línea de Ahram Biosystems®. Los oligonucleótidos utilizados para el gen del antígeno O157 (rfbE; GenBank acceso No. S83460.1): f-Biotin-GGAT-GACAAATATCTGCGCTGC y r-Digoxigenin-GGT-GATTCCTTAATTCCTCTCTTCC, y para el gen del antígeno flagelar H7 (fliC; GenBank acceso No. AF228487): f-Biotin-GCGCGAAGTTAAACACCACC y r-FAM-CGGTGACTTTATCGCCATTCC [6]; se utilizó 1 µL de ADN genómico como templado. La cPCR se llevó a cabo utilizando un termociclador portátil operado por batería y de convección térmica PALM PCR (Mod. G3, Ahram Biosystem®). La velocidad utilizada fue turbo 3 (T3) con una temperatura de anillamiento de 56°C. Las reacciones de cPCR incluyeron 35 ciclos (11 minutos).

## Resultados y discusión

Los resultados de la especificidad de los oligonucleótidos con la cPCR se presentan en la Figura 1. A) muestra la altura de los amplicones para el gen del antígeno O157 (rfbE, 213 pb) y el gen del antígeno flagelar H7 (fliC, 108 pb) cuando se utilizó ADN puro de la cepa STEC O157:H7-CIBNOR siendo consistente con lo reportado por Kim et al., 2018 [6]. B) muestra el inmunoensayo de flujo lateral marcando adecuadamente las líneas para los amplicones de los genes bajo estudio en el caso del control positivo (cepa O157:H7-CIBNOR), mientras que en el caso del control negativo (ST) solo se observa la banda en el control.

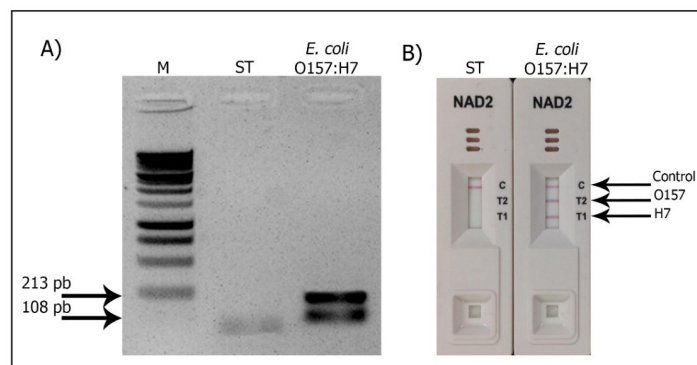
A partir de las 36 muestras de partícula suspendida se obtuvo una colección de 79 aislados que presentaron características macroscópicas en agar Rainbow® O157; al momento 13 aislados han sido analizados utilizando cPCR (sitio 1, 4 cepas; sitio 2, 9 cepas). La figura 2 muestra los resultados que demuestra la ausencia de la STEC O157:H7, siendo congruentes con lo reportado por Yanamala et al. (2011) [7] y Berry et al. (2015) [8] donde la STEC O157:H7 estuvo ausente en muestras de partícula suspendida (1m<sup>3</sup>), en distancias de hasta 45 y 180 metros respectivamente, contiguas a corrales de ganado bovino. Se continuará con el estudio del resto de los aislados, y adicionalmente se trabajará con la PCR multiplex acorde a Rivas-Ruíz y cols., (2020) [5], a efecto de establecer la presencia de los genes *stx1* y *stx2*.

## Conclusión

El estudio continúa en desarrollo; sin embargo, de forma preliminar y considerando el aislamiento selectivo de cepas sospechosas a STEC O157:H7 y no O157 en agar cromogénico Rainbow® O157 es factible su movimiento en aire/partícula suspendida debiendo esto demostrarse por el grupo de trabajo.

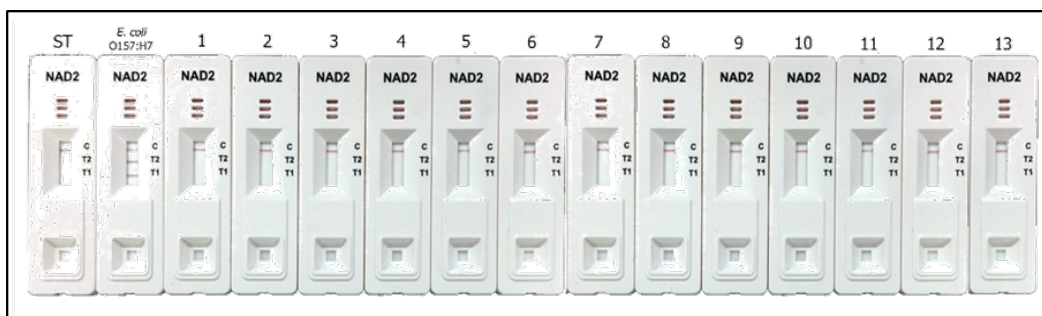
## Agradecimientos

Este estudio fue soportado financieramente por el Laboratorio de Investigación en Microbiología del Departamento de Biotecnología y Ciencias Alimentarias a través del proyecto autofinanciable folio 2022-0373 y la empresa BIOERA México® con el apoyo y soporte internacional de Ahram Biosystems® en Corea del Sur.



**Figura 1.** Detección específica de *E. coli* O157:H7 empleando cPCR. A) Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (0.33 mg/mL) B) Ensayos NALF2.

ST: Sin Templado (agua ultrapura); M: marcador de peso molecular 1kb DNA Ladder (Cat. G571A, PROMEGA); ADNg de *E. coli* O157:H7 (cepa CIBNOR)



**Figura 2.** Detección específica de *E. coli* O157:H7 empleando cPCR y ensayos NALF2.

Sin Templado (agua ultrapura); ADNg de *E. coli* O157:H7 (cepa CIBNOR); 1 – 13, cepas aisladas en el estudio.

## Referencias

1. Terajima J, Izumiya H, Hara-Kudo Y, Ohnishi M. Shiga Toxin (Verotoxin)-producing *Escherichia coli* and Foodborne Disease: A Review. *Food Safety*. 2017;5(2):35-53.
2. Gould LH, Walsh KA, Vieira AR, et al. Surveillance for foodborne disease outbreaks—United States, 1998–2008. *Morbidity and Mortality Weekly Report: Surveillance Summaries*. 2013;62(2):1-34.
3. Boyer O, Niaudet P. Hemolytic uremic syndrome: new developments in pathogenesis and treatment. *International Journal of Nephrology*. 2011;2011
4. Heredia N, García S. Animals as sources of food-borne pathogens: A review. *Animal nutrition*. 2018;4(3):250-255.
5. Rivas-Ruiz CM, Cantú-Soto EU, Maldonado-Mendoza IE, et al. Detección de *Escherichia coli* productora de toxina-Shiga en bovinos asintomáticos del sur de Sonora, México. *Ecosistemas y recursos agropecuarios*. 2020;7(2)
6. Kim T-H, Hwang HJ, Kim JH. Ultra-fast on-site molecular detection of foodborne pathogens using a combination of convection polymerase chain reaction and nucleic acid lateral flow immunoassay. *Foodborne pathogens and disease*. 2018;16(2):144-151.
7. Yanamala S, Miller M, Loneragan G, Gragg S, Brashears M. Potential for microbial contamination of spinach through feedyard air/dust growing in close proximity to cattle feedyard operations. *Journal of Food Safety*. 2011;31(4):525-529.
8. Berry ED, Wells JE, Bono JL, et al. Effect of proximity to a cattle feedlot on *Escherichia coli* O157: H7 contamination of leafy greens and evaluation of the potential for airborne transmission. *Applied and Environmental Microbiology*. 2015;81(3):1101-1110.