



Prevalence of virulence genes of *Escherichia coli* in surface waters of the Rio Bravo in Reynosa city, Tamaulipas

Prevalencia de genes de virulencia de *Escherichia coli* en aguas superficiales del Río Bravo en la ciudad de Reynosa, Tamaulipas

Rocío Requena-Castro¹, María Guadalupe Aguilera-Arreola², Ana Verónica Martínez-Vázquez¹, Virgilio Bocanegra-García^{1*}

¹Laboratorio de Medicina de Conservación, Centro de Biotecnología Genómica, Instituto Politécnico Nacional. Boulevard del Maestro SN esq. Elías Piña, Col. Narciso Mendoza. C. P. 88710 Cd. Reynosa Tamaulipas. E-mail: vbocanegg@hotmail.com

²Escuela Nacional de Ciencias Biológicas IPN, Prolongación de Carpio y Plan de Ayala s/n, Santo Tomás, 11340 Miguel Hidalgo, CDMX

*Corresponding author.

E-mail address: vbocanegg@hotmail.com (V. Bocanegra-García).

Article history:

Received: 30 December 2017 / Received in revised form: 14 May 2018 / Accepted: 15 May 2018 / Published online: 1 July 2018.

<https://doi.org/10.29267/mxjb.2018.3.3.87>

ABSTRACT

The aim of this work was to determine the presence of virulence genes in strains of *E. coli* isolated in Rio Bravo in Reynosa city Tamaulipas. The detection of genes encoding virulence factors such as *eae*, *bfp*, *stx1* and *stx2* in surface water samples was using the PCR technique. *stx2* gene was the most prevalent gene (27%) followed by *stx1* (10%). Although the rest of the samples were considered commensal strains due to they did not have any of the proposed genes, the presence of the *stx1* and *stx2* genes are considered a risk to the population that has contact with the surface water of Rio Bravo. Therefore a microbiological monitoring is necessary in this area.

Keywords: *Escherichia coli*, virulence genes, Reynosa and Rio Bravo.

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue determinar la presencia de genes de virulencia en cepas de *E. coli* aisladas del Río Bravo en la ciudad de Reynosa Tamaulipas. Mediante la técnica de PCR se realizó la detección de los genes que codifican para factores de virulencia como son *eae*, *bfp*, *stx1* y *stx2* en muestras de aguas superficiales del Río Bravo en el municipio de Reynosa Tamaulipas y se identificó que el gen *stx2* (27%) fue el más prevalente, seguido de *stx1* (10%). Aunque el resto de las muestras fueron consideradas comensales al no tener ninguno de los genes propuestos, la presencia de genes *stx1* y *stx2* son considerados como un riesgo a la población que tiene contacto con el agua superficial del Río Bravo, por lo cual es necesario un monitoreo microbiológico en esta zona.

Palabras clave: *Escherichia coli*, genes de virulencia, Reynosa y Río Bravo.

1. INTRODUCCIÓN

Escherichia coli es una bacteria gram negativa perteneciente a la familia enterobacteriaceae, y puede encontrarse en diversos ambientes como son: cuerpos de aguas, suelos, en diferentes alimentos y de manera comensal en animales, y humanos (Liu *et al.*, 2008). A pesar de que *E. coli* es un buen indicador de calidad del agua, la detección microbiológica no indica la presencia de factores de virulencia que las agrupa en diferentes patovariantes como son: *E. coli* enteropatogénica (EPEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* adherente difusa (DAEC) y *E. coli* productora de toxina Shiga conocida también como *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) (Koczura *et al.*, 2013). A nivel mundial las infecciones por *E. coli* son un problema de salud pública, lo que afecta principalmente a niños menores de 5 años. En México se ha reportado a la cepa de *E. coli* enteropatogénica en una prevalencia del 6% en casos humanos (Hernández-Cortés *et al.*, 2011). Entre las principales formas de contraer una infección por *E. coli* se encuentran, el tener una mala higiene, el consumo de alimentos contaminados, e incluso el contacto con agua contaminada por coliformes fecales. En Tamaulipas uno de los ríos más importantes es el Río Bravo, el cual es utilizado para riego de hortalizas, usos recreativos e industriales, pero poco se sabe sobre su calidad microbiológica. Aunque la calidad microbiológica del agua puede ser monitoreada mediante la detección de indicadores de calidad del agua como son *Enterococcus* spp. y *E. coli*, estos no son suficientes para identificar las cepas virulentas, las cuales podrían estar presentes en cuerpos de agua. Por lo cual, el objetivo de este trabajo fue determinar la prevalencia de genes de factores de virulencia en EHEC y STEC para determinar si existe un riesgo sanitario hacia la población que utiliza el agua del Río Bravo.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Recolección de las muestras

Se tomó 1 L de agua superficial por cada punto de muestreo en el municipio de Reynosa, Tamaulipas. Las muestras fueron recolectadas en frascos de un litro, estériles, a una

profundidad no mayor a 30 cm. La distancia entre cada punto de muestro fue aproximadamente entre 1.5 y 2.5 km. Se transportó en refrigeración hasta el laboratorio y las muestras se procesaron el mismo día su toma. Las características del lugar y la ubicación se muestran en la Tabla 1.

2.2 Identificación microbiológica de *Escherichia coli*

Se colocaron 25 mL de agua superficial en 225 mL de caldo lactosado. Posteriormente se incubaron a 37°C entre 18 y 24 horas. El medio selectivo utilizado fue EMB (Eosine methylene blue, McLab) del cual las colonias verde brillantes fueron aisladas en medio TSA (Tryptic soy agar Difco), las placas fueron incubadas a 37°C por 24 h, obteniendo así cultivos puros para la identificación Bioquímica. La identificación Bioquímica se realizó utilizando las siguientes pruebas: producción de indol, rojo de metilo y movilidad (SIM), Voges-Proskauer (Difco), Urea (Dibico) y Citrato de Simmons (Difco).

Tabla 1. Ubicación y descripción de los sitios de muestreo en el Río Bravo.

Sitios	Ubicación	Descripción
R1	26°11'08.2"N 98°25'10.8"O	Presencia de viviendas a menos de 100 metros del Río Bravo
R2	26°13'24.7"N 98°31'35.0"O	Presencia de ganado
R3	26°04'05.6"N 98°12'37.9"O	Cerca del puente internacional Reynosa-Pharr
R4	26°07'03.2"N 98°17'58.9"O	Presencia de animales de granja
R5	26°07'05.9"N 98°17'02.6"O	Presencia de vivienda a menos de 100 metros del Río Bravo
R6	26°06'07.0"N 98°17'59.6"O	Basurero municipal a 500 metros del río
R7	26°09'23.6"N 98°22'51.4"O	Zona natural no se observó contaminación por actividades antropogénicas
R8	26°09'25.0"N 98°23'06.7"O	A un de kilómetro se la zona se observó casas y un cementerio
R9	26°09'26.0"N 98°22'13.6"O	Presencia de viviendas y poca basura
R10	26°07'59.0"N 98°19'56.3"O	Presencia de caballos y actividades de pesca
R11	26°05'43.8"N 98°16'20.5"O	Cerca del puente internacional Reynosa-Hidalgo, presencia de materia fecal cerca del río
R12	26°05'05.2"N 98°15'50.8"O	Presencia de actividades de pesca y fogatas
R13	26°08'43.8"N 98°20'02.9"O	Presencia de gallinas, perros y personas nadando y pescando
R14	26°07'19.0"N 98°19'28.9"O	Cerca puente internacional Anzalduas

2.3 Identificación del gen *mdh* para *E. coli* mediante PCR

La obtención del ADN fue mediante lisado celular calentando a 95°C por 15 minutos seguido de una centrifugación a 13,000 g por 3 minutos. La PCR se realizó utilizando 5 µL de amortiguador 5X, 1.8 µL de MgCl₂ (25 mM), 0.3 µL dNTPs (10 mM), 0.3 µL de cada iniciador *mdh* F 5'ggatggatcgttccgacct 3', *mdh* R 5'ggcagaatggaacaccagagt 3' (10 mM), 5 U de *Taq* flexi (Promega) llevando a un volumen final de 15 µL con agua MiliQ estéril. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: Desnaturalización inicial a 95 °C por 1 minuto, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 95°C por 45 s, una temperatura de alineamiento de 53°C, una extensión de 72 °C por 45 s, y una temperatura final de extensión de 72 °C por 7 minutos. Una banda de 304 pb es positiva para *E. coli* (Omar & Barnard, 2014).

2.3 Detección molecular de los genes de virulencia en cepas de *E. coli*

La detección los genes que codifican para los factores de virulencia *stx1* (192 pb), *stx2* (96 pb), *eae* (365 pb) y *bfp* (282 pb) se realizó con las condiciones de Canizalez *et al.* (2013). Como control positivo se utilizó la cepa *E. coli* O157:H7. La PCR se llevó a cabo en un Termociclador de la marca Multigene LabNet International. Las muestras se corrieron en un gel de agarosa al 1.5%, teñido con SYBR Gold y visualizado en un Transiluminador de la marca KODAK (2003, Alemania).

3. RESULTADOS

Se muestrearon un total de 14 sitios en el municipio de Reynosa, Tamaulipas de los cuales se aislaron 40 cepas fueron aisladas mediante pruebas bioquímicas. Al realizar la PCR para la detección del gen *mdh*, se detectó el gen en el 92.5% de las cepas. El gen *stx2* fue el más prevalente (27%) seguido del gene *stx1* (10%) y el gen *bfp* (7.5%), el gen *eae* no se detectó en ninguna de las muestras. Se encontró co-detección de genes en una solo cepa que pertenecía al punto R2 (*bfp* y *stx2*). Con relación a los sitios de muestreo en el sitio R13 se presentaron dos genes de factores de virulencia (*stx1* y *stx2*), la distribución de los genes de virulencia con respecto a los sitios de muestreo se observan en la Fig. 1. En los sitios R7, R8, R10, R12 y R14 no se detectó ninguno de los genes de virulencia propuestos en este trabajo. El porcentaje de cepas que presentaron genes de virulencia fue de 42.5%.

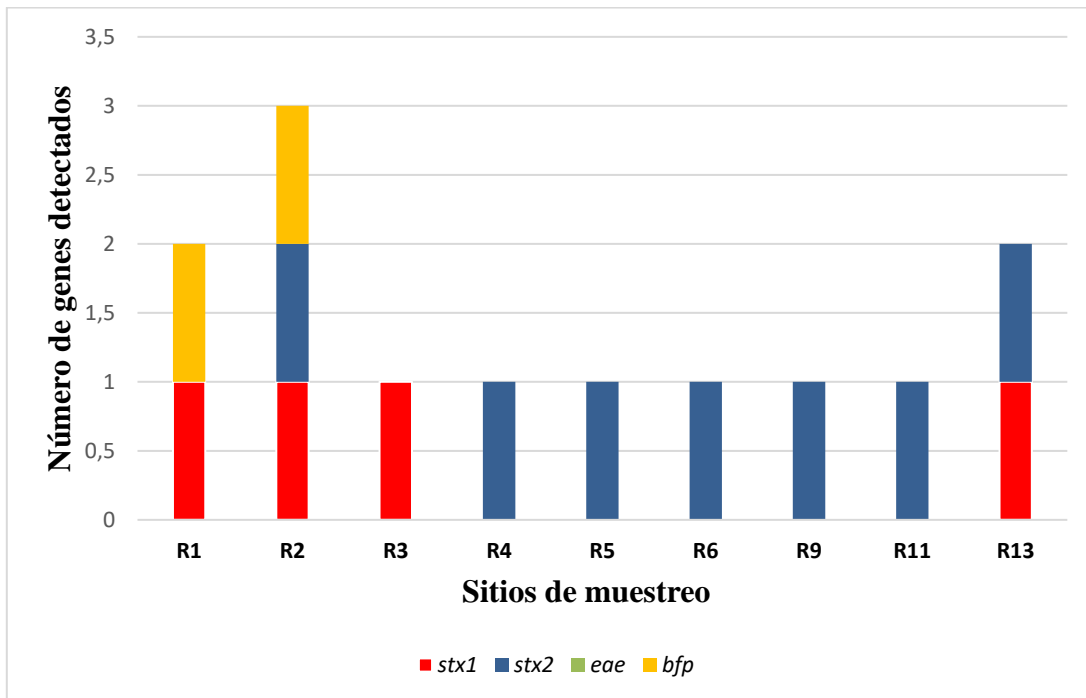


Fig. 1. Distribución de los genes de virulencia en los puntos de muestreo del Río Bravo en la Ciudad de Reynosa, Tamaulipas. Los puntos que no aparecen en la gráfica no presentaron genes de virulencia.

4. DISCUSIÓN

Los cuerpos de aguas superficiales como son los ríos están expuestos a contaminantes a causa de actividades antropogénicas debido al rápido crecimiento de la población e industrialización (Ram *et al.*, 2009). En el Río Bravo las actividades recreativas, animales de ganado cerca y actividades industriales estuvieron presentes mayormente. Las aguas superficiales que presentan contaminación son consideradas como reservorios ideales para la diseminación y transferencia de genes tanto de resistencia antimicrobiana como de factor de virulencia. *E. coli* está compuesta por *E. coli* comensal y las patovariantes diarrogénicas como son ETEC, EAEC, EPEC y EIEC las cuales son cepas que se ha reportado en cuerpos de agua superficiales (Omar & Barnard, 2014), cabe mencionar que la dosis infectiva baja de *E. coli* patogénicas es de 1 a 10 células (Kuhnert *et al.*, 2000). Por esta razón, la presencia de *E. coli* patogénicas en aguas ambientales representa un riesgo potencial para el ser humano y los animales, especialmente cuando el agua es usada para riego de hortalizas, como fuente de agua potable o actividades recreativas (Ramírez-Castillo *et al.*, 2013). En este estudio la mayor prevalencia de los genes de factores de virulencia detectados fueron *stx1* y *stx2*, lo que concuerda con lo publicado por Ahmed *et al.* (2016) en Australia, quienes reportaron que la mayor prevalencia de los genes de virulencia estaba asociados a las cepas STEC (*eae*, *stx1* y *stx2*), por lo que mencionan que las cepas patógenas STEC se han encontrado mayormente en ambientes acuíferos. Aunque en otros estudios se ha

detectado prevalencia de EAEC, no se descarta la presencia de STEC en aguas superficiales (Ndlovu *et al.*, 2015). En México poco se sabe sobre la caracterización de los genes de virulencia presentes en cepas de *E.coli* provenientes de aguas de ríos, aunque existen estudios en verduras como son tomates (Gomez-Aldapa *et al.*, 2013) y animales de granja como son lechones (Toledo *et al.*, 2012) indicando también similitudes en la prevalencia de STEC. A pesar de que en el 42.5% de las cepas no se detectaron factores de virulencia (por lo cual se consideran comensales), la presencia de los genes *stx1* y *stx2* fue de 27% y 10%, lo que pone de manifiesto un posible riesgo a la población que utiliza el agua proveniente del Río Bravo, por lo que la presencia de estos genes en cepas de *E. coli* aisladas del Río Bravo en Reynosa Tamaulipas podría considerarse un riesgo a los seres vivos en contacto con el agua superficial contaminada por cepas potencialmente patógenas de *E. coli*.

AGRADECIMIENTOS

Becaria CONACYT RRC, Becario SNI, COFAA y EDI VBG.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

REFERENCIAS

- Ahmed W., Gyawali P & Toze S. 2016. Quantitative PCR measurements of *Escherichia coli* including shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) in animal feces and environmental waters. *Environmental Science & Technology*. 3; 49(5):3084-90.
- Canizalez-Roman A., Gonzalez-Nuñez E., Vidal J. E., Flores-Villaseñor H. & León-Sicairos N. 2013. Prevalence and antibiotic resistance profiles of diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from food items in northwestern Mexico. *International Journal of Food Microbiology*. 3; 164(1):36-45.
- Gómez-Aldapa C.A., Torres-Vitela Mdel R., Acevedo-Sandoval O.A., Rangel-Vargas E., Villarruel-López A. & Castro-Rosas A. 2013. Presence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, Enteroinvasive *E. coli*, Enteropathogenic *E. coli*, and Enterotoxigenic *E. coli* on tomatoes from public markets in Mexico. *Journal of Food Protection*. 76(9): 1621-5.
- Hernández-Cortéz C., Aguilera-Arreola M.G & Castro-Escarpulli G. 2011. Situación de las enfermedades gastrointestinales en México. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología* 31(4): 137-151.
- Koczura R., Mokracka J., Barczak A., Krysiak N. & Kaznowski A. 2013. Association between the presence of class 1 integrons, virulence genes, and phylogenetic groups of *Escherichia coli* isolates from river water. *Microbial Ecology*. 65(1):84-90.
- Kuhnert, P., Boerlin, P. & Frey, J., 2000. Target genes for virulence assessment of *Escherichia coli* isolates from water, food and the environment. *FEMS Microbiology reviews*. 24(1):107-17.

Liu Y., Gilchrist A., Zhang J. & Li X. F. 2008. Detection of viable but nonculturable *Escherichia coli* O157:H7 bacteria in drinking water and river water. *Applied and Environmental Microbiology*. 74(5):1502-7.

Ndlovu T., Le Roux M., Khan W. & Khan S. 2015. Co-detection of virulent *Escherichia coli* genes in surface water sources. *PLoS One*. 10(2): e0116808.

Omar K.B. & Barnard T.G. 2014. Detection of diarrhoeagenic *Escherichia coli* in Clinical and environmental water sources in South Africa using single-step. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. (30): 2663-2671.

Ramírez Castillo F. Y., Avelar González F. J., Garneau P., Márquez Díaz F., Guerrero Barrera A. L. & Harel J. 2013. Presence of multi-drug resistant pathogenic *Escherichia coli* in the San Pedro River located in the State of Aguascalientes, Mexico. *Frontiers in Microbiology*. 4:147.

Ram S., Vajpayee P., Singh R. L. & Shanker R. 2008. Surface water of a perennial river exhibits multi-antimicrobial resistant shiga toxin and enterotoxin producing *Escherichia coli*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 72(2):490-5.

Toledo A., Gómez D., Cruz C., Carreón R., López J, Giono S. & Castro A. M. 2011. Prevalence of virulence genes in *Escherichia coli* strains isolated from piglets in the suckling and weaning period in Mexico. *Journal of Medical Microbiology*. 61:148-56.