

Escherichia coli verocitotoxigénico (VTEC). Características de virulencia y persistencia en el medio ambiente.

POLIFRONI, R^{1, 2}; ETCHEVERRÍA, A I^{1, 3}; PADOLA, N L^{1, 3}; PARMA, A E^{1, 3}.

Resumen

Argentina es el país con mayor número de casos de SUH a nivel mundial. Los bovinos son el principal reservorio de *Escherichia coli* verocitotoxigénico (VTEC) y los rodeos argentinos presentan una alta prevalencia de este patógeno. En la región pampeana se ha comprobado que el ganado de pastoreo y los animales de engorde a corral son portadores de serotipos VTEC muy virulentos. Sin embargo, estos patógenos son aislados del medio ambiente con baja frecuencia. Una posible explicación estaría basada en la capacidad de VTEC de formar biofilms y/o entrar en un estado fisiológico de no culturabilidad. Esta característica haría que escapen a la detección por medios tradicionales de microbiología, siendo imprescindible el uso de técnicas moleculares.

Palabras clave: VTEC, medioambiente, ganado, síndrome urémico hemolítico.

Verocytotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC). Characteristics of virulence and persistence in the environment.

Summary

Argentina has the highest recorded frequency of HUS in the world. Cattle are the main reservoir of verocytotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) and Argentine herds have a high prevalence of these pathogens. In the Pampeana region, grazing and feedlot cattle are carriers of highly virulent serotypes. Despite this, VTEC is isolated with low frequency from the environment. An explanation could be the ability of VTEC to form biofilm or to enter in a nonculturable state. These characteristics would make these clusters of cells undetectable by traditional microbiology methods, justifying the use of molecular techniques.

Key words: VTEC, environment, cattle, uremic hemolytic syndrome.

¹ Laboratorio de Inmunquímica y Biotecnología. Dpto. SAMP, Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires. ² Becaria Doctoral - Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica-FONCYT. ³ Comisión de Investigaciones Científicas Prov. Bs. As.

Recibido: 1.10.2009 - Aceptado: 19.11.2009

Introducción

Argentina es el país con mayor incidencia de SUH a nivel mundial (13,9/100000 niños menores de 5 años). El principal agente causal es *Escherichia coli* enterohemorrágico (EHEC)²⁶. EHEC agrupa a los serotipos aislados de casos de colitis hemorrágica (CH) y síndrome urémico hemolítico (SUH) en humanos. Sin embargo, EHEC forma parte de un grupo mayor llamado *Escherichia coli* verocitotoxigénico (VTEC), con capacidad de sintetizar citotoxinas denominadas verocitotoxinas o shiga toxinas^{2, 15}. Una forma importante de diferenciar VTEC es mediante la serotipificación, que a menudo es el punto inicial de la caracterización¹². El serotipo O157:H7 es el más aislado en casos de SUH, seguido por O145:H-, aunque también se han aislado los serotipos O5:H-, O26:H11, O91:H21, O103:H2, O104:H21, O111:H-, O113:H2; O113:H21, O121:H-, O121:H19, O157:H- y O165:H25^{11, 15, 26}. Debido a que el serotipo no es necesariamente indicativo de la virulencia, estas cepas se pueden clasificar en patotipos según los factores de virulencia que poseen y la enfermedad clínica que producen, y alternativamente, se pueden agrupar como O157 y no-O157²¹.

Los factores de virulencia críticos de VTEC son las verocitotoxinas VT1 y VT2, que producen muerte celular en los tejidos de los órganos afectados (riñón, intestino, hígado, páncreas y sistema nervioso central)²⁷. Otros factores de virulencia importantes para VTEC son: una adhesina llamada intimina (codificada por el gen *eae*), necesaria para la lesión de adherencia y borrado del enterocito (lesión A/E) y una hemolisina enterohemorrágica (EhxA)²¹.

Los genes *vt1* y *vt2* se encuentran codificados en fagos que se insertan en el cromosoma bacteriano, lo que facilitaría la transmisión horizontal de la información a bacterias no patógenas, pudiendo transformarlas en VTEC². Existen variantes de las toxinas (VT1, VT1c y VT1d, así como VT2,

VT2c, VT2d, VT2e, VT2f y VT2g) que se han relacionado con distintos grados de patogenicidad^{12, 14}. Aunque la mayoría de los casos son causados por cepas portadoras del gen *eae*, éste no sería esencial para la virulencia de VTEC, ya que se ha identificado una proteína autoaglutinante de membrana externa (Saa) en las cepas *eae*-negativas que estaría implicada en la adherencia del patógeno al epitelio intestinal²³. Sin embargo, Werber y cols. (2003)³³ han demostrado una estrecha asociación entre la presencia de los genes *eae* y *vt2* en cepas aisladas de casos de SUH.

Reservorios animales y vías de transmisión

La mayoría de los brotes se producen por el consumo de alimentos contaminados. Carne mal cocida, vegetales de hoja y agua contaminados, leche no pasteurizada, frutas, salames, mayonesa y yogurt, han sido responsables de brotes y casos aislados de CH y SUH^{6, 25}. En las últimas dos décadas ha aumentado la importancia del medioambiente como fuente de contagio, según lo reflejan los numerosos estudios recopilados por Fremaux y cols. (2008)¹⁰.

Estudios realizados en Argentina han corroborado que el bovino es el principal reservorio de VTEC^{17, 18, 22, 30}. Se estableció que la prevalencia de VTEC en bovinos de pastoreo de la Pampa Húmeda es del 32,8 %, mientras que en animales de feedlot la prevalencia de VTEC asciende al 63%^{22, 30}. El muestreo seriado realizado en bovinos de feedlot permitió confirmar la liberación intermitente de VTEC, la cual podría ser la causa de la transmisión y reinfección entre animales²². El sistema de producción de tambo también puede contribuir al riesgo de infección por el consumo de leche cruda o productos lácteos contaminados, sin desestimar que parte de la carne faenada para consumo proviene de ese origen⁴. Fernández y cols. (2007)⁷ detectaron en 5 tambos de Argentina, una prevalencia de VTEC del 37,5% en vacas y

43% en terneros, siendo la toxina VT2 el factor de virulencia hallado con mayor frecuencia.

VTEC en el medio ambiente

Franz y cols.(2007)⁹ encontraron una prevalencia de VTEC del 79,5 % en abonos provenientes de 25 tambos en Países Bajos. LeJeune y cols. (2001)¹⁶ observaron que los sedimentos de bebederos contaminados con heces de vacunos excretores de *E. coli* O157 puede servir como reservorio del microorganismo por más de 245 días, sin perder su capacidad infectiva para terneros durante 6 meses. En numerosos casos y brotes de SUH se han identificado como fuente de la infección a las aguas superficiales y el suelo de campos donde había animales portadores de VTEC no-O157^{13, 31, 10}. Estos datos no hacen más que confirmar la presencia de VTEC en el medio ambiente y su capacidad de adaptación ante condiciones adversas.

La supervivencia de *E. coli* O157:H7 frente a condiciones de estrés en medios ácidos y diferentes temperaturas ha sido estudiada por muchos investigadores, pero poco se conoce sobre el efecto del estrés en otros serotipos. Molina y cols. (2003)²⁰ estudiaron *in vitro* el comportamiento de distintos serotipos de VTEC (O26:H11, O91:H21, O111:H-, O145:H-, O157:H7 y O174:H21) de los cuales O91:H21 presentó la mayor resistencia al estrés ácido.

Estrategias de supervivencia

Células viables pero no cultivables (VNC).

E. coli tiene la capacidad de entrar en este estado cuando se encuentra en un ambiente estresante^{1, 5, 34}. Las bacterias viables pero no cultivables (VNC) son células metabólicamente activas incapaces de multiplicarse y formar colonias en los medios regularmente utilizados en los laboratorios, a menos que sean incubadas en presencia de metabolitos

antioxidantes, ácido pirúvico y la enzima catalasa con una alta disponibilidad de nutrientes¹⁹. En este caso, el uso de métodos tradicionales de identificación de VTEC basados en el cultivo de una muestra podría dar resultados falsos negativos, representando un potencial riesgo para la salud si se emplean en la detección de contaminación fecal. Por lo tanto, es indispensable la búsqueda del patógeno con técnicas que no requieren el cultivo del microorganismo, como PCR-Directo⁸. Los métodos basados en PCR pueden detectar específica y sensiblemente *E. coli* O157 y otras VTEC aún en bajas concentraciones, aunque no distinguen células vivas de muertas.

En nuestro laboratorio realizamos la inoculación experimental de O157:H7 en agua esterilizada procedente de bebederos y conservada a temperatura ambiente. Logramos recuperar células viables de O157:H7 hasta el día 117 pos-inoculación por medio del recuento de colonias (Polifroni y col, datos no publicados). En este experimento, se compararon los resultados del recuento de colonias en placas con las estimaciones de UFC determinadas por DO₆₀₀. La diferencia de UFC observada entre ambas técnicas nos permitió hipotetizar sobre la presencia de células injuriadas o estresadas que no lograban formar colonias, a pesar de que pudieran hallarse viables⁵. Para corroborarlo, cultivamos muestras del agua con recuento de colonias inferior a 10 UFCml⁻¹ sobre agar LB enriquecido con 0,1% de piruvato de sodio, logrando aumentar significativamente el número de colonias (Polifroni y col, datos no publicados).

Formación de biofilms

E. coli O157 y otros patógenos pueden formar biofilms cuando se encuentran en medios nutricionalmente deficientes (agua, suelo y superficies inertes). La adherencia y la formación de biofilms en instalaciones dedicadas al procesamiento y elaboración de

alimentos es un riesgo a tener en cuenta en el sistema de aseguramiento de riesgos y puntos críticos de control (H.A.C.C.P.)³⁰.

Los biofilms son comunidades bacterianas que viven adheridas a superficies mediante fimbrias y exopolisacáridos producidos por las mismas bacterias²⁵. La formación de esta comunidad, posiblemente compuesta por bacterias de diferentes géneros y especies, implica una interacción coordinada de muchas células al unísono siguiendo una serie de etapas definidas dependientes de las condiciones ambientales²⁵. Se ha identificado que la fimbria curli, junto con la celulosa, es uno de los componentes mayoritarios de la matriz extracelular del biofilm de diversos aislamientos de *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* y *E. coli*²⁹. La transcripción de la unidad proteica de curli (CsgA) está regulada por el CsgD y por un regulador metabólico general (Crl)³². Distintos fenotipos de curli han sido identificados en los patotipos de *E. coli* enteropatógeno (EPEC) y *E. coli* enterotoxigénico (ETEC)³. En nuestro laboratorio hemos estudiado 14 aislamientos VTEC respecto a su fenotipo curli mediante cultivo en placas de Rojo Congo (RC)³⁰. Los aislamientos fueron recuperados de muestras procedentes del medioambiente de tambo y mostraron diferentes fenotipos relacionados con el lugar del aislamiento (Polifroni y col, datos no publicados). Por ejemplo, los aislamientos obtenidos de hisopados de superficies sólidas presentaron fenotipo productor de fimbria, mientras que los obtenidos de agua de los bebederos de animales y del suelo de los corrales no la expresaron, aún cuando todos los aislamientos poseían la información genética para hacerlo. Entonces, la expresión de determinado fenotipo de fimbria curli estaría determinada por la superficie disponible para adherirse.

La baja prevalencia de VTEC en muestras ambientales podría deberse en parte a la capacidad de formar biofilm.

Conclusión

Numerosos estudios han confirmado al bovino como el principal reservorio de VTEC y se han identificado los serotipos más prevalentes. Se ha estudiado el rol de los bebederos y de los suelos de los corrales como vías de transmisión de O157:H7 para los animales. Sin embargo, el aislamiento de VTEC en los ambientes de producción ha sido muy bajo y no se ha determinado si la infección de los animales se produce por contacto directo (animal-animal) o por compartir un medioambiente contaminado.

Resultados obtenidos *in vitro* demostraron la capacidad de ciertos serotipos de sobrevivir a condiciones estresantes como pH ácido, presencia de ácidos orgánicos y diferentes temperaturas. Las estrategias de supervivencia de VTEC en el medioambiente podrían estar relacionadas a su adaptación a condiciones adecuadas a través de la formación de biofilms o de entrar en el estado VNC. Esto podría enmascarar los resultados de las pruebas de diagnóstico con el consiguiente riesgo para la Salud Pública, considerando que Argentina es el país con mayor incidencia de SUH a nivel mundial. Por lo tanto, son necesarios más estudios para dilucidar los mecanismos por los que VTEC sobrevive en el medioambiente, fuera de su reservorio principal.

Agradecimientos

En la obtención de los resultados expuestos también han participado: G. H. Arroyo, M.E. Sanz, P. M. A. Lucchesi, A. Krüger, D. Fernández y Téc. Aux. M. R. Ortíz. Los estudios fueron financiados por FONCyT, CIC, CONICET y UNICEN. A:E Parma, N.L Padola y A. I. Etcheverría son miembros de la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC-PBA). R. Polifroni es becaria de FONCyT.

Bibliografía

1. Awais R, Fukudomi H, Miyanaga K et al. A recombinant bacteriophage-based assay for the discriminative detection of culturable and viable but nonculturable *Escherichia coli* O157:H7. *Biotechnol. Prog.* 2006; 22: 853-9.
2. Blaser MJ. Bacteria and Diseases of Unknown Cause: Hemolytic-Uremic Syndrome. *J. Infect. Dis.* 2004; 189: 552-63.
3. Brokranz W, Wang X, Tschäpe H et al. Expression of cellulose and curli fimbriae by *Escherichia coli* isolated from the gastrointestinal tract. *J. Med. Microbiol.* 2005; 54: 1171-82.
4. Deschênes G, Casenave C, Grimont F et al. Cluster of cases of haemolytic uraemic syndrome due to unpasteurised cheese. *Ped. Nephrol.* 1996; 10: 203-5.
5. Douglas BK, Kaprelyants A S, Weichart D H et al. Viability and activity in readily culturable bacteria: a review and discussion of the practical issues. *A. Van Leeuw. J. Microb.* 1998; 73: 169-87.
6. Feng P. Changing patterns of food borne transmission of STEC [Abstract S04.1]: VTEC 2009 – 7th. International Symposium on Shiga Toxin (Verocytotoxin)-Producing *Escherichia coli* Infections, Buenos Aires, Mayo 10-13, 2009. Buenos Aires: Asociación Argentina de Microbiología.
7. Fernández D, Rodríguez E, Arroyo G H et al. Excreción de *Escherichia coli* verocitotoxigénico (VTEC) en vacas en ordeño en diferentes estaciones del año. [Abstract 178]: XI Congreso Argentino de Microbiología. Córdoba, Argentina. 11-12 de Octubre, 2007. Córdoba: Rev. Arg. Microb. pp.39.
8. Fode-Vaughan KA, Maki JS, Benson JA et al. Direct PCR detection of *Escherichia coli* O157:H7. *Lett. Appl. Microbiol.* 2003; 37: 239-43.
9. Franz E, Klerks MM, De Vos OJ et al. Prevalence of shiga toxin-producing *Escherichia coli* *stx1*, *stx2*, *eaeA*, and *rfbE* genes and survival of *E. coli* O157:H7 in manure from organic and low-input conventional dairy farms. *Appl. Environ. Microb.* 2007; 73: 2180-90.
10. Fremaux B, Prigent-Combaret C, Vernozy-Rozand C. Long-term survival of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in cattle effluents and environment: An updated review. *Vet. Microbiol.* 2008; 132:1-18.
11. Griffin P M. Epidemiology of shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) infections in the United States [Abstract S02.2]: VTEC 2009 – 7th. International Symposium on Shiga Toxin (Verocytotoxin)-Producing *Escherichia coli* Infections, Buenos Aires, Mayo 10-13, 2009. Buenos Aires: Asociación Argentina de Microbiología.
12. Gyles CL. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. *J. Anim. Sci.* 2007; 85: 45-62.
13. Hoshina K, Itagaki A, Seki R et al. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26 Outbreak Caused by Contaminated Natural Water Supplied by Facility Owned by Local Community. *Jpn. J. Infect. Dis.* 2001; 54: 247-8.
14. Karch H, Tarr PI, Bielaszewska M. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in human medicine. *Int. J. Med. Microbiol.* 2005; 295: 405-18.
15. Karmali M, Mascarenhas M, Shen S. et al. Association of genomic O island 122 of *Escherichia coli* EDL933 with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* seropathotypes that are linked to epidemic and/or serious disease. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41: 4930-40.
16. LeJeune JT, Besser TE, Hancock DD. Cattle water troughs as reservoirs of *Escherichia coli* O157. *Appl. Environ. Microb.* 2001; 67: 3053-7.
17. Meichtri L, Miliwebsky E, Gioffré A et al. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in healthy young beef steers from Argentina: prevalence and virulence properties. *Int. J. Food Microbiol.* 2004; 96: 189-98.
18. Mercado EC, Gioffré A, Rodríguez SM et al. Non-O157 Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* Isolated from Diarrhoeic Calves in Argentina. *J. Vet. Med.* 2004; 51 (2): 82- 88.
19. Mizuone Y, Wai SN, Takade A et al. Restoration of culturability of starvation-stressed and low-temperature-stressed *Escherichia coli* O157 cells by using H₂O₂-degrading compounds. *Arch. Microbiol.* 1999; 172: 63-7.
20. Molina PM, Parma AE, Sanz ME. Survival in acidic and alcoholic medium of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 and non-O157:H7 isolated in Argentina. *BMC Microbiol.* 2003; 3: 17-23.
21. Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews.* 1998; 11: 142-201.

22. Padola NL, Sanz ME, Blanco JE et al. Serotypes and virulence genes of shigatoxigenic *Escherichia coli* (STEC) isolates from a feedlot in Argentina. *Vet. Microbiol.* 2004; 100: 3-9.
23. Paton AW, Srimanote P, Woodrow MC et al. Characterization of Saa, a novel autoagglutinating adhesin produced by locus of enterocyte effacement-negative shiga toxigenic *Escherichia coli* strains that are virulent for human. *Infect Immun.* 2001; 69: 6999-7009.
24. Prûâ BM, Besemann C, Denton A et al. A complex transcription network controls the early stages of biofilm development by *Escherichia coli*. Minireview. *J. Bacteriol.* 2006; 188: 3731-39.
25. Rangel JM, Sparling PH, Crowe C et al. Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 Outbreaks, United States, 1982–2002. *Emer. Infect. Dis.* 2005; 11(4): 603-9.
26. Rivas M, Milliwebsky E, Chinen I et al. Epidemiología del síndrome urémico hemolítico em Argentina. Diagnóstico del agente etiológico, reservorios y vias de transmisión. *Medicina.* 2006; 66(3):27:32.
27. Rivero MA, Padola NL, Etcheverría AI et al. *Escherichia coli* enterohemorrágica y síndrome urémico hemolítico en Argentina. *Medicina.* 2004; 64: 352-6.
28. Robbe-Saule V, Jaumouillé V, Prévost MC et al. Crl activates transcriptional initiation of RpoS-regulated genes involved in the multicellular behavior of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *J. Bacteriol.* 2006; 188: 3983-94.
29. Ryu JH, Beuchat LR. Biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7 on stainless steel: effect of Exopolysaccharide and Curli production on its resistance to chlorine. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005; 71: 247-54.
30. Sanz ME, Viñas MR, Parma AE. Prevalence of bovine verotoxin-producing *Escherichia coli* in Argentina. *Eur. J. Epidemiol.* 1998; 14: 399-403.
31. Tani K, Kaneshige M, Nasu M. Distribution and Diversity of shiga toxine 2 gene in urban river. *J. Health Sci.* 2007; 53(4): 486-90.
32. van Houd R, Michiels C. Role of bacterial cell surface structure in *Escherichia coli* biofilm formation. *Res. Microbiol.* 2005; 156: 626-33.
33. Werber D, Fruth A, Buchholz U et al. Strong association between shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 and virulence genes *stx2* and *eae* as possible explanation for predominance of serogroup O157 in patients with haemolytic uraemic syndrome. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2003; 22:726–30.
34. Winfield MD, Groisman EA. Minireview: Role of nonhost environments in the lifestyles of *Salmonella* and *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003; 69(7): 3687-94.