

Nuevo patrón genético de *Escherichia coli* O157:H7 biotipo "B" en Argentina

New genetic pattern of Escherichia coli O157:H7 biotype "B" in Argentina

► Claudio Marcelo Zotta^{1*}, Carolina Carbonari^{2**}, Diana Gómez^{3*}, Natalia Deza^{2**}, Silvina Lavayén^{4*}, Elizabeth Miliwebsky^{2**}, Victoria Monzani^{5***}, Eduardo Manfredi^{2**}, Laura Morvay^{5***}, Marta Rivas^{2**}

1. Técnico Químico. Servicio Bacteriología, INE "Dr. Juan H. Jara" - ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán"
2. Bioquímico. Servicio Fisiopatogenia, INEI-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán"
3. Médica Veterinaria, Bacterióloga Clínica e Industrial. Servicio Bacteriología, INE "Dr. Juan H. Jara" - ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán"
4. Licenciada en Química. Servicio Bacteriología, INE "Dr. Juan H. Jara" - ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán"
5. Bioquímica. Hospital Interzonal Materno Infantil "Sr. Victorio Tetamanti"

* Instituto Nacional de Epidemiología "Dr. Juan H. Jara" (INE). Departamento de Diagnóstico y Referencia. Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud "Dr. Carlos G. Malbrán" (ANLIS), Ituzaingo 3520, 7600 Mar del Plata, Argentina.

** Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INEI). Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud "Dr. Carlos G. Malbrán" (ANLIS), Av. Vélez Sarsfield 563, 1281 Buenos Aires, Argentina.

*** Hospital Interzonal Especializado Materno Infantil "Sr. Victorio Tetamanti", Castelli 2450, 7600 Mar del Plata, Argentina.

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorpora al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957

ISSN 1851-6114 en línea

ISSN 1852-396X (CD-ROM)

Resumen

Argentina tiene el índice más alto de casos de síndrome urémico hemolítico (SUH) en el mundo. Brotes y casos esporádicos de SUH se han asociado a *Escherichia coli* O157:H7 productor de toxina Shiga (STEC). El objetivo del estudio fue comparar la diversidad genética y la relación clonal de *Escherichia coli* O157:H7 biotipo B. Cuatro cepas biotipo B fueron aisladas de dos pacientes con SUH y de dos contactos asintomáticos convivientes, en la ciudad de Mar del Plata. Se realizó PCR para detectar los genes *stx*₁, *stx*₂, *rfb*_{O157}, *eae*, *ehxA* y *fliC*_{H7} y electroforesis en gel en campos pulsados (*Xba*I-PFGE) para establecer la diversidad genética y la relación clonal. Todas las cepas presentaron los genes *stx*₂, *stx*_{2c(vh-a)}, *eae*, *ehxA* y *fliC*_{H7}, y pertenecieron al fagotipo 2. Por *Xba*I-PFGE fueron identificados tres patrones que demostraron alta relación clonal y fueron considerados relacionados al mismo acontecimiento, sin nexo epidemiológico establecido entre los casos de SUH. Estos patrones de *Xba*I-PFGE eran nuevos, porque no estaban incluidos en la base de datos de *E. coli* O157 en Argentina. Usando herramientas estandarizadas de detección y tipificación para el diagnóstico, los laboratorios de referencia podrán detectar la aparición de nuevos clones asociados con enfermedades humanas.

Palabras clave: *Escherichia coli* O157:H7 biotipo B * diversidad genética * relación clonal * electroforesis en gel en campos pulsados

Summary

Argentina has the highest rate of cases of hemolytic uremic syndrome (HUS) in the world. Outbreaks and sporadic cases of HUS have been associated with O157:H7 Shiga toxin-producer *Escherichia coli* (STEC). The aim of this study was to compare the genetic diversity and clonal relatedness of *Escherichia coli* O157:H7 biotype B. Four biotype B strains were isolated from two patients with HUS and two asymptomatic household contacts in the city of Mar del Plata. PCR was performed to detect *stx*₁, *stx*₂, *rfb*_{O157}, *eae*, *ehxA* and *fliC*_{H7} genes, and

pulsed-field gel electrophoresis (XbaI-PFGE) to establish the genetic diversity and the clonal relatedness. All strains harbored the *stx*₂, *stx*_{2c(vh-a)}, *eae*, *ehxA* and *fliC*_{H7} genes and belonged to phage type 2. By means of XbaI-PFGE, three patterns were identified, showing high clonal relatedness and related to the same event, but there was no established epidemiological link between cases of HUS. These patterns of XbaI-PFGE were new, because they were not included in the database of *E. coli* O157 in Argentina. Using tools of detection and classification for diagnosis, reference laboratories will be able to detect the emergence of new clones associated with human diseases.

Key words: *Escherichia coli* O157:H7 biotype B * genetic diversity * clonal relatedness * pulsed-field gel electrophoresis

Introducción

Escherichia coli O157:H7 productor de toxina Shiga (STEC) es el serotipo más frecuentemente identificado como causante de enfermedad humana (1) y es reconocido como patógeno emergente transmitido por alimentos, asociado a casos esporádicos y brotes de diarrea con o sin sangre, colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico (SUH).

El objetivo del presente trabajo fue comparar la diversidad genética y establecer la relación clonal de cepas de *Escherichia coli* O157:H7 del biotipo B (fermentador de dulcitol y rafinosa, no fermentador de ramnosa), aisladas de pacientes con SUH y contactos asintomáticos en la ciudad de Mar del Plata.

Materiales y Métodos

Durante febrero y marzo de 2007 se aislaron 4 cepas de *E. coli* O157:H7 biotipo B del total de la vigilancia de laboratorio, provenientes de dos pacientes con SUH y de dos contactos asintomáticos.

Caso de SUH#1: niña de 3 años y 8 meses de edad que comenzó el día 8 de febrero de 2007 con diarrea acuosa evolucionando a diarrea sanguinolenta, fiebre y disminución de la diuresis. Al momento de la internación estos síntomas persistían presentando, además, anemia hemolítica, insuficiencia renal y plaquetopenia. Durante los 12 días que duró la internación se le realizó diálisis peritoneal y transfusión sanguínea, evolucionando favorablemente hasta alcanzar el alta médica. Residió junto a su familia en Mar del Plata.

Caso SUH#2: niña de 2 años y 9 meses de edad que presentó el día 26 de febrero de 2007 un comienzo brusco de diarrea sanguinolenta, dolor abdominal y oliguria, persistiendo estos síntomas al momento de la internación y presentando también equimosis y petequias, compromiso microangiopático del sistema nervioso central y convulsiones. Durante los días de internación se le realizó a la paciente una diálisis peritoneal. El día 1 de marzo de 2007 falleció por paro cardio-respiratorio.

Contactos asintomáticos convivientes del caso SUH#2: CA#2-A hermano de 5 años y CA#2-B abuela de 55 años. Esta familia era oriunda de la ciudad de Mar de Ajó, Provincia de Buenos Aires.

Se realizó el estudio de persistencia de excreción de este microorganismo entre los afectados.

Las cepas fueron caracterizadas por PCR para amplificar los genes *stx*₁, *stx*₂, *rfb*_{O157}, *eae*, *ehxA* y *fliC*_{H7} (2-4) y subtipificadas por fagotipificación (5) y por la técnica de macrorrestricción con la enzima *Xba*I y separación por electroforesis de campos pulsados (*Xba*I-PFGE), según el protocolo estandarizado por el *Center for Diseases Control*, Atlanta, GA, EE.UU., con algunas modificaciones (6).

Resultados

Las 4 cepas de *E. coli* O157 biotipo B aisladas portadoras de los genes *stx*₂, *stx*_{2c(vh-a)}, *eae*, *ehxA* y *fliC*_{H7}, fueron sensibles a todos los antimicrobianos ensayados y pertenecían al fagotipo 2.

Por subtipificación se obtuvieron 3 patrones *Xba*I-PFGE bien definidos: AREXHX01.0447 (CA#2-B), AREXHX01.0448 (SUH#2), AREXHX01.0449 (SUH#1, CA#2-A). Los patrones AREXHX01.0447 y AREXHX01.0448 presentaron 95,2% de similitud según criterio de Tenover, *et al.* (7), y los patrones AREXHX01.0448 y AREXHX01.0449 presentaron 97,6% de homología con sólo una banda de diferencia (Fig. 1).

El estudio de persistencia de excreción sólo demostró excreción prolongada en el CA#2-B, con 20 días de duración a partir del primer coprocultivo.

Discusión y Conclusiones

Los patrones de *Xba*I-PFGE detectados son nuevos, pues no existían previamente en la Base de Datos de *E. coli* O157 de Argentina. Estos patrones presentaron una alta relación clonal por lo que se los considera relacionados al mismo evento.

El CA#2-B excretó el microorganismo durante 20 días. Si bien está dentro del rango de excreción que des-

Dice (Opt:1,50%) (Tol 1,5%-1,5%) (H>0,0% S>0,0%) [0,0%-98,3%]

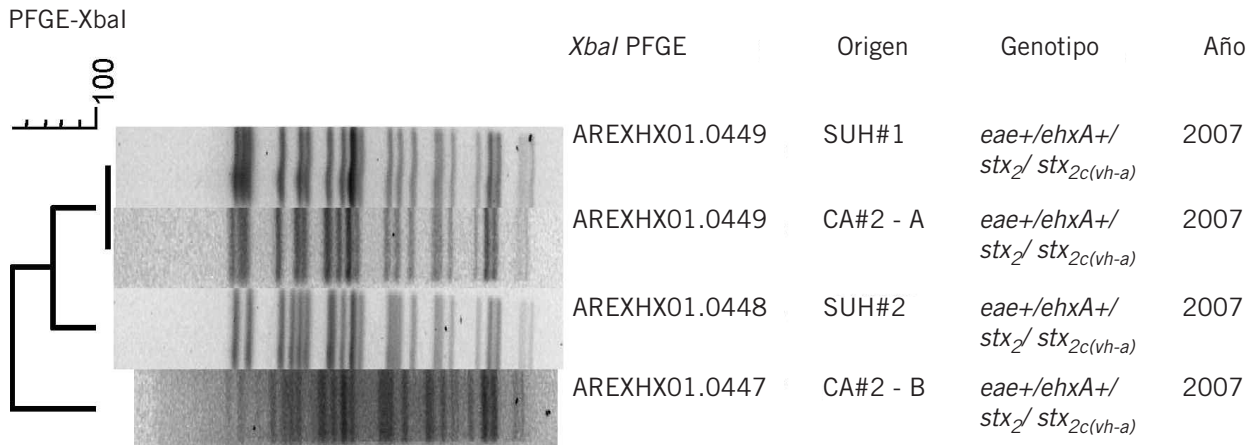


Figura 1. Relación clonal de cepas biotipo B por XbaI-PFGE

criben diversos trabajos (8), estas cepas mantuvieron su potencial infectante-patogénico sin observarse modificaciones en el patrón de macrorrestricción obtenido por XbaI-PFGE.

Fenotípicamente es importante el hallazgo de cepas de *E. coli* O157:H7 del biotipo B, porque las cepas circulantes en Argentina corresponden mayoritariamente al biotipo C (fermentador de dulcitol, rafinosa y ramosa), y hasta el momento en Mar del Plata no se había detectado la circulación de biotipo B.

Las evidencias halladas entre los distintos casos y contactos asintomáticos fueron insuficientes para relacionarlos epidemiológicamente. Sin embargo, el estudio molecular de las cepas indicaría la probabilidad de la existencia de un nexo vinculante, ya que las cepas presentaron una alta homología clonal entre afectados de diferentes localidades y en un lapso de tiempo aproximado de un mes, haciendo presumir la posibilidad de ocurrencia de un brote difuso.

Es fundamental la aplicación de técnicas de epidemiología molecular en tiempo real para mejorar la vigilancia de *E. coli* O157, reforzando los resultados de laboratorio con los epidemiológicos para la implementación de medidas de prevención y control adecuadas.

CORRESPONDENCIA

CLAUDIO MARCELO ZOTTA
E-mail: marcelozotta@hotmail.com

Referencias bibliográficas

1. Mead PS, Griffin PM. *Escherichia coli* O157:H7. Lancet 1998; 352: 1207-12.
2. Pollard DR, Johnson WM, Lior H, Tyler SD, Pozze KR. Rapid and specific detection of verotoxin genes in *Escherichia coli* by the polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 1990; 28: 540-5.
3. Gannon VP, Rashed M, Kin RK, Thomas EJ. Detection and characterization of the *eae* gene of Shiga like toxin-producing *Escherichia coli* using polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 1993; 31: 1268-74.
4. Schmidt H, Beutin L, Karch H. Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933. Infect Immunol 1995; 63: 1055-61.
5. Khakhria R, Duch D, Lior H. Extended phage-typing scheme for *Escherichia coli* O157:H7. Epidemiol Infect 1990; 105: 511-20.
6. Foodborne and Diarrheal Diseases Branch, Division of Bacterial and Mycotic Diseases, National Center for Infectious Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, Standardized Molecular Subtyping of Foodborne Bacterial Pathogens by Pulsed-Field Gel Electrophoresis. A Training manual, Atlanta, GA, U.S.A.; 1998.
7. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol 1995; 33: 2233-9.
8. Gómez D, Miliwebsky E, Silva A, Deza N, Zotta CM, Cotella O, et al. Aislamiento de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga durante un brote de gastroenteritis en un Jardín Maternal de la ciudad de Mar del Plata. Rev Argent Microbiol 2005; 37: 176-83.

Aceptado para su publicación el 7 de agosto de 2009