

# Aislamiento de *Escherichia coli* O145:NM en casos de síndrome urémico hemolítico

## *Escherichia coli* O145:NM isolated from hemolytic uremic syndrome cases

► Diana Gómez<sup>1\*</sup>, Isabel Chinen<sup>2\*\*</sup>, Claudio Marcelo Zotta<sup>3\*</sup>, Carolina Carbonari<sup>2\*\*</sup>, Silvina Lavayén<sup>4\*</sup>, Victoria Monzani<sup>5\*\*\*</sup>, Natalia Deza<sup>2\*\*</sup>, Laura Morvay<sup>5\*\*\*</sup>, Marcela Cepeda<sup>6\*\*\*</sup>, Marta Rivas<sup>2\*\*</sup>

1. Médica Veterinaria, Bacteriología Clínica e Industrial. Servicio Bacteriología, INE "Dr. Juan H. Jara" - ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán".
2. Bioquímica. Servicio Fisiopatogenia, INEI-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán".
3. Técnico Químico. 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 Especializado Materno Infantil "Sr. Victorio Tetamanti".
6. Enfermera. Hospital Interzonal Especializado 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), Ituzaingó 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

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957

ISSN 1851-6114 en línea

ISSN 1852-396X (CD-ROM)

## Resumen

En Argentina se notifican más de 500 nuevos casos de síndrome urémico hemolítico (SUH) anuales. El objetivo del trabajo fue investigar epidemiológicamente casos de SUH y contactos de los que se aislaron cepas de STEC O145:NM que pertenecían a un mismo *cluster*. Para detectar STEC se realizó PCR-múltiple para amplificar genes de toxinas Shiga 1 y 2, y otros marcadores de virulencia como *eae* y *ehxA*. Se subtipificó STEC por separación por electroforesis de campos pulsados (*Xba*I-PFGE). Entre enero y febrero de 2006, en tres casos de SUH y un contacto familiar conviviente se identificó STEC O145:NM. Genotípicamente se caracterizaron como productores de *stx*2, *eae*+ y *ehxA*+. Todas las cepas presentaron el mismo patrón por *Xba*I-PFGE (AREXSX01.0207) y por *Bln*I-PFGE (AREXSA26.0018). Estas cepas pertenecieron a un mismo *cluster*, diseminado en distintos barrios de la ciudad de Mar del Plata. Los datos de la investigación epidemiológica fueron incompletos para establecer un nexo entre los casos. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de ocurrencia de un brote difuso. Se destaca la importancia que tiene el sistema de vigilancia de laboratorio en tiempo real mediante PFGE como mecanismo de alerta que sirve para afianzar los resultados con los datos de epidemiología.

**Palabras clave:** síndrome urémico hemolítico \* STEC O145:NM \* brote difuso

## Summary

More than 500 new cases of hemolytic uremic syndrome (HUS) are annually reported in Argentina. The aim of this work was to carry out epidemiological studies on cases of HUS and their household contacts that were isolated from STEC O145 strains: NM belonging to the same cluster. In order to detect STEC, Multiplex PCR was performed to amplify Shiga toxin 1 and 2 genes and other virulence markers like *eae* and *ehxA*. STEC was sub-typified by means of separation by pulsed field electrophoresis (PFGE-*Xba*I). Between January and February 2006, STEC O145:NM strains were identified

in three cases of HUS and one household contact. Genotypically, they were characterized as producing *stx2*, *eae+* and *ehxA+*. All strains showed the same pattern by PFGE-*Xba*I (AREXSX01.0207) and *Bln*I-PFGE (AREXSA26.0018). These strains belonged to the same cluster, scattered in different areas of the city of Mar del Plata. Data from epidemiological research were not enough to establish a link between the cases. However, the possibility of occurrence of a diffuse outbreak, is not ruled out. The importance of a laboratory surveillance system in real time by PFGE is stressed, as a warning mechanism that serves to strengthen the results with epidemiologic data.

**Key words:** hemolytic uremic syndrome \* STEC O145:NM \* diffuse outbreak

## Introducción

Argentina presenta la tasa más alta de incidencia mundial de casos de síndrome urémico hemolítico (SUH) en la población infantil, notificándose más de 500 nuevos casos anuales, una tasa de letalidad de alrededor de 3% y una tasa de notificación hospitalaria del 15,0 por 100.000 niños menores de 5 años en 2007 (1). Con el objetivo de fortalecer la notificación y seguimiento de los casos y facilitar el control y la prevención de esta enfermedad se ha puesto en marcha el seguimiento de esta patología y la investigación de brotes de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga (STEC) a través de la vigilancia por la modalidad de Unidades Centinelas (UC).

La mayoría de los brotes epidémicos y casos esporádicos de SUH se han asociado con cepas STEC del serotipo O157:H7/NM, aislándose del resto de los pacientes otros serotipos como O26:H11, O103:H2, O111:NM, O113:H21, O145:NM, que también han sido implicados como causantes de enfermedad humana severa (2-4).

El consumo de alimentos contaminados, principalmente los de origen bovino, el contacto directo e indirecto con animales y la transmisión persona a persona han sido señalados como las vías más importantes de transmisión de STEC (5). Esta última vía de infección ha sido documentada en jardines maternos y de infantes, y en centros de asistencia a enfermos mentales, entre otros (6) (7). El riesgo se incrementa debido a la baja dosis infectiva del patógeno (8).

Debido a los cambios en la producción y distribución de los alimentos, ha aparecido un nuevo tipo de presentación de brotes: brotes difusos que involucran comunidades, estados y países. El brote es detectado porque se produce una concentración de casos en una localidad o porque el patógeno causal es poco frecuente o porque el laboratorio identifica algún subtipo en muestras de una amplia área (9).

Un episodio de brote puede ser "localizado" cuando los recursos epidemiológicos permiten circunscribirlo a un edificio, establecimiento, pueblo o comunidad estrictamente delimitada. De no presentarse estas condiciones el brote pasa a ser "difuso" (10).

Actualmente, ocurren brotes que no son fácilmente

identificables por epidemiología pero que pueden ser detectados mediante la electroforesis de campo pulsado (PFGE) en tiempo real. Esta técnica permite detectar aumentos en la frecuencia de un patrón (*cluster*), lo cual estaría indicando un aumento en el número de casos debido a una misma cepa.

El objetivo de este trabajo fue investigar epidemiológicamente casos de SUH y contactos de los que se aislaron cepas de STEC O145:NM que pertenecían a un mismo *cluster*.

## Materiales y Métodos

Para la identificación de STEC se sembraron placas de agar MacConkey con sorbitol (Difco, Laboratorios, Detroit, MI, EEUU) que fueron incubadas a 37 °C durante 18 h (11). Se realizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR-múltiple) de la zona de crecimiento confluyente y de las colonias presuntivas utilizándose los oligonucleótidos específicos que amplifican los fragmentos de los genes de las toxinas Shiga 1 y 2 (*Stx1*, *Stx2*) y el gen *rfbO157* (12). La caracterización genotípica de los marcadores de virulencia accesorios, *eae* y enterohemolisina (*ehxA*), se efectuó también por PCR según lo descrito por Ganon, *et al.* (13), y por Schmidt, *et al.* (14), respectivamente.

La subtipificación de los aislamientos de STEC se cumplimentó con la aplicación de 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 (15).

La investigación epidemiológica se realizó según metodología de investigación de brote (16) encuestándose a los casos y a sus respectivos contactos convivientes.

## Resultados

### CARACTERIZACIÓN DE LOS CASOS

De los registros de la vigilancia por UC se estableció que durante un período de 40 días, entre enero y fe-

Dice (Op t:1.50 %) (Tol 1.5 %-1.5 %) (H>0.0 % S>0.0% ) [0.0% -98.3%]

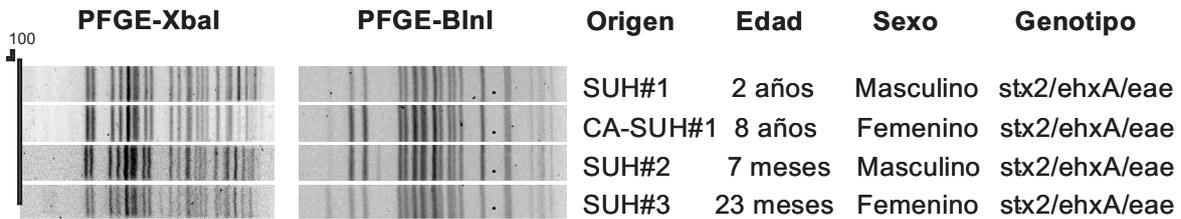


Figura 1. Relación clonal de cepas STEC O145:NM aisladas en Mar del Plata.

XbaI PFGE: ARENMX01.0061 (former AREXSX01.0207) - BlnI PFGE: ARENMA26.0001 (former AREXSA26.0018) - Cluster/Outbreak Code: 06MPENM.001c.

brero de 2006, en tres casos de SUH y un contacto familiar conviviente se identificó *Escherichia coli* O145:NM

La edad de los casos oscilaba entre los 7 meses y los 2 años, mientras que el contacto asintomático, hermana de uno de los afectados, tenía 8 años de edad. Los casos presentaron un comienzo insidioso de la enfermedad, con diarrea sanguinolenta, dolor abdominal y vómitos, observándose en dos casos fiebre, pero sin compromiso del sistema nervioso central. Todos fueron dados de alta sin registrarse defunciones.

De la encuesta epidemiológica utilizada en esta vigilancia surgió que los alimentos ingeridos siempre eran elaborados en el hogar y que la probable exposición se debió a la falta de higiene de los utensilios de cocina después de cortar carne cruda, ya que no se constataron otros posibles factores.

Los afectados eran residentes en diferentes barrios de la ciudad de Mar del Plata, contando con el abastecimiento de agua corriente dentro de la casa, recolección domiciliar de residuos y la eliminación de residuales líquidos a través de red cloacal.

#### CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA

Los aislamientos de *E. coli* serotificados como O145:NM fueron fermentadores de sorbitol y sensibles a los antimicrobianos ensayados según protocolo de vigilancia de STEC.

Genotípicamente se caracterizaron como productores de *stx2*, *eae+* y *ehxA+*.

Todas las cepas estudiadas presentaron el mismo patrón por *XbaI*-PFGE (AREXSX01.0207) y por *BlnI*-PFGE (AREXSA26.0018) (Figura 1).

#### Discusión y Conclusiones

Las cepas STEC O145:NM pertenecieron a un mismo *cluster*, diseminado en distintos barrios de la ciudad de Mar del Plata. Los datos de la investigación epidemiológica fueron incompletos para establecer un nexo entre

los casos. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de ocurrencia de un brote difuso.

Si bien no se estableció un determinado alimento ingerido como vehículo de transmisión para el agente patógeno en estudio, se consideró que, dada la elaboración siempre casera de las comidas, el principal factor de riesgo constituyó la contaminación cruzada producida por la inadecuada higiene de las manos y de los utensilios de cocina después de manipular y cortar carne cruda durante la elaboración de los alimentos.

De este trabajo se destaca la importancia que tiene el sistema de vigilancia de laboratorio en tiempo real mediante PFGE como mecanismo de alerta que sirve para afianzar los resultados con los datos de epidemiología, pudiéndose visualizar rápidamente de esta manera la diseminación de un *cluster*.

#### CORRESPONDENCIA

DRA. DIANA GÓMEZ  
Servicio de Bacteriología General  
Instituto Nacional de Epidemiología "Dr. Juan H. Jara"  
Ituzaingó 3520 - 7600 MAR DEL PLATA, Argentina  
Tel.: 0223-473-2100 / 3449 / 8405  
E-mail: digomez@ine.gov.ar

#### Referencias bibliográficas

1. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas – Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud "Dr. Carlos G. Malbrán", Servicio de Fisiopatología / Sociedad Argentina de Pediatría - Comité de Nefrología. Buenos Aires; 2007.
2. Dorn CR, Scotland SM, Smith HR, Willshaw GA, Rowe B. Properties of Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* of human and animal origin belonging to serogroups other than O157:H7. *Epidemiol Infect* 1989; 103: 83-95.
3. Scotland SM, Rowe B, Smith HR, Willshaw GA, Gross RJ. Verocytotoxin-producing strains of *Escherichia coli* from children with haemolytic uraemic syndrome and

- their detection by specific DNA probes. *J Med Microbiol* 1988; 25: 237-43.
4. Tzipori S, Wachsmuth KI, Smithers J, Jackson C. Studies in gnotobiotic piglets on non-O157:H7 *Escherichia coli* serotypes isolated from patients with hemorrhagic colitis. *Gastroenterology* 1988; 94: 590-7.
  5. Griffin PM, Tauxe RV. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiol Rev* 1991; 13: 60-98.
  6. O'Donnell JM, Thornton L, McNamara EB, Prendergast T, Igoe D, Cosgrove C. Outbreak of Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in a child day care facility. *Commun Dis Public Health* 2002; 5: 54-8.
  7. Pavia AT, Nichols CR, Green DP, Tauxe RV, Mottice S, Greene KT, *et al.* *Escherichia coli* O157:H7 infections in institutions for mentally retarded persons: clinical and epidemiologic observations. *J Pediatric* 1990; 116: 544-51.
  8. Dorn CR. Review of foodborne outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection in the western United States. *JAMA* 1993; 203: 1583-7.
  9. Olea Normandín AM. Vigilancia de Brotes de Enfermedades Transmitidas por Alimentos en un escenario de patógenos emergentes. *Bol Vigil Salud Pública Chile* 2003; 6(18): 31-2.
  10. Armijo Rojas R. Curso de Epidemiología, 2ª ed. Expresiones frecuentes en Epidemiología. Santiago: Escuela de Salubridad Universidad de Chile; 1964.
  11. Rivas M, Miliwebsky E, Deza N. Manual de Procedimientos: Diagnóstico y caracterización de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga. Buenos Aires: INEIANLIS "Carlos Malbrán"; 2003.
  12. 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.
  13. 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.
  14. Schmidt H, Beutin L, Karch H. Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933. *Infect Immunologic* 1995; 63: 1055-61.
  15. 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, Estados Unidos de América; 1998.
  16. Cotella O y Grupo de Trabajo. Enfermedades transmitidas por alimentos. Investigación de brote. Mar del Plata: Instituto Nacional de Epidemiología "Dr. Juan H. Jara", Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud "Dr. Carlos G. Malbrán"; 2001.

**Aceptado para su publicación el 22 de diciembre de 2009**