



INFORME BREVE

Aislamiento de *Escherichia coli* enteropatógeno O157:H16 de un caso de diarrea infantil y sus contactos familiares en La Pampa, Argentina



CrossMark

Ivana M. Silveyra^{a,b,*}, Adriana M. Pereyra^{a,b}, María G. Alvarez^b,
Mariana D. Villagran^b, Andrea B. Baroni^a, Natalia Deza^c,
Claudia C. Carbonari^c, Elizabeth Miliwebsky^c y Marta Rivas^c

^a Laboratorio de Microbiología, Hospital Gobernador Centeno, General Pico, La Pampa, Argentina

^b Comité de Epidemiología, Hospital Gobernador Centeno, General Pico, La Pampa, Argentina

^c Servicio Fisiopatología, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas-ANLIS «Dr. Carlos G. Malbrán», Buenos Aires, Argentina

Recibido el 31 de diciembre de 2014; aceptado el 23 de agosto de 2015

Disponible en Internet el 25 de noviembre de 2015

PALABRAS CLAVE

Escherichia coli
O157:H16;
EPEC;
Diarrea

KEYWORDS

Escherichia coli
O157:H16;
EPEC;
Diarrhea

Resumen *Escherichia coli* enteropatógeno (EPEC) es uno de los principales agentes de diarrea infantil aguda en los países en desarrollo. Se clasifica en típico (tEPEC) y atípico (aEPEC) sobre la base de la presencia del factor *bfp*, asociado a la adherencia y codificado en el plásmido pEAF. Se describe el aislamiento de *E. coli* O157:H16, de la categoría aEPEC, en un caso de diarrea sanguinolenta infantil y en sus contactos familiares. De las muestras de materia fecal del niño, de la madre, del padre y de la hermana se aisló *E. coli* O157:H16 *eae*-ε-positivo, sorbitol-positivo, β-glucuronidasa-positivo, sensible a los antimicrobianos ensayados, y negativo para los factores *stx*₁, *stx*₂, *ehxA* y *bfp*. Por *Xba*I-PFGE, todos los aislamientos presentaron el patrón de macrorrestricción AREHX01.1040, con 100% de similitud. Es importante la vigilancia epidemiológica de los casos de diarrea asociados a *E. coli* O157 y sus contactos familiares, y la incorporación de técnicas para detectar los distintos patotipos de *E. coli*.

© 2015 Asociación Argentina de Microbiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Isolation of enteropathogenic *Escherichia coli* O157:H16 identified in a diarrhea case in a child and his household contacts in La Pampa Province, Argentina

Abstract Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) is a major causative agent of acute diarrhea in children in developing countries. This pathotype is divided into typical EPEC (tEPEC) and atypical EPEC (aEPEC), based on the presence of the *bfp* virulence factor associated with

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: ivanasilveyra@hotmail.com (I.M. Silveyra).

adhesion, encoded in the pEAF plasmid. In the present study, the isolation of aEPEC O157:H16 from a bloody diarrhea case in a child and his household contacts (mother, father and sister) is described. The strain was characterized as *E. coli* O157:H16 eae- ϵ -positive, sorbitol fermenter with β -glucuronidase activity, susceptible to all antimicrobials tested, and negative for virulence factors *stx*₁, *stx*₂, *ehxA* and *bfp*. *Xba*I-PFGE performed on all isolates showed the AREHX01.1040 macrorestriction pattern, with 100% similarity. These results highlight the importance of epidemiological surveillance of *E. coli* O157-associated diarrhea cases identified in children and their family contacts, as well as the incorporation of molecular techniques that allow the detection of the different *E. coli* pathotypes.

© 2015 Asociación Argentina de Microbiología. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Escherichia coli es parte de la flora facultativa que coloniza el intestino humano. Sin embargo, algunas cepas de *E. coli* están asociadas con gastroenteritis y diarrea humana, y la infección se produce principalmente a través de la vía fecal-oral. Estas cepas son causa importante de morbimortalidad en los países en desarrollo¹⁵.

Con el nombre de *E. coli* diarreigénico (DEC) se denomina a un grupo heterogéneo de cepas que poseen distintos factores de virulencia y distinta interacción con la mucosa intestinal del hospedador. Estas cepas causan diferentes síndromes diarreicos y tienen distinta epidemiología.

Históricamente, se definieron 5 patotipos de DEC: *E. coli* productor de toxina Shiga (STEC), *E. coli* enteropatógeno (EPEC), *E. coli* enterotoxigénico (ETEC), *E. coli* enteroinvasivo (EIEC) y *E. coli* enteroagregativo (EAEC). Además se ha propuesto un sexto patotipo denominado *E. coli* de adherencia difusa, aunque su capacidad patogénica e implicancia epidemiológica todavía no está lo suficientemente dilucidada, pues se lo encuentra con frecuencia similar en niños con diarrea y sin ella^{8,15}. Sin embargo, la emergencia de un nuevo patotipo denominado *E. coli* enteroagregativo hemorrágico (EAHEC), asociado a un brote ocurrido en Alemania y otros países en 2011, ha llevado a preguntar si STEC representa un patotipo en sí mismo o múltiples patotipos de *E. coli*, cuya virulencia se ha incrementado por la adquisición de fagos-*stx*¹⁴.

EPEC es uno de los principales agentes causantes de diarrea infantil aguda y de brotes en los países en desarrollo^{3,15}. Fue descrito por primera vez en los EE. UU. en la década de los 40 (concretamente, en 1945) por Bray, quien refirió la asociación de cepas de *Escherichia* antigénicamente homogéneas con brotes de diarrea infantil («diarrea de verano») en Inglaterra. En el mismo período, Varela *et al.* describieron la asociación de una cepa de *E. coli* (*E. coli*-gomez) en un caso de diarrea mortal en un niño de México³.

En 1955, Neter *et al.*¹⁰ crearon la expresión EPEC para designar a aquellas cepas de *E. coli* relacionadas epidemiológicamente con la diarrea infantil y diferenciarlas de las cepas de la flora normal.

Actualmente, el patotipo EPEC se divide en EPEC típico (tEPEC) y EPEC atípico (aEPEC), basado en la presencia del factor de virulencia EAF, asociado a la adherencia y codificado en el plásmido pEAF, presente en tEPEC y ausente en aEPEC³. Ambos grupos producen una lesión característica en las células intestinales conocida como

A/E (del inglés, *attaching and effacing*), de adherencia y borrado de las microvellosidades, que resulta de la acción cooperativa de proteínas codificadas en un isla de patogenidad denominada *locus of enterocyte effacement* (locus LEE). Además, las cepas tEPEC y aEPEC carecen de los genes que codifican las toxinas Shiga (Stx) de STEC y las toxinas termolábiles y termoestables de ETEC, y no son invasivas³.

Hasta la década de los 90, las cepas de tEPEC fueron los principales agentes causantes de diarrea aguda en niños muy pequeños en países en desarrollo, incluidos los países de América Latina. En la actualidad, hay una clara disminución de su frecuencia en muchos de estos países³. Por el contrario, las cepas aEPEC, agentes importantes de diarrea en países desarrollados desde los años 60, son emergentes de diarrea aguda y persistente, y afectan a niños y adultos en todo el mundo^{3,5}. En algunos estudios, la frecuencia de aEPEC es similar en individuos sanos y con diarrea. Sin embargo, aEPEC ha sido encontrado en pacientes con diarrea de distintas edades y en pacientes adultos con virus de la inmunodeficiencia humana-sida³.

Se ha descrito el aislamiento de cepas aEPEC en diferentes especies animales con diarrea o sin esta, como vacas, ovejas, cabras, cerdos, aves de corral, venados y monos tití. Aunque no hay evidencia de transmisión directa del animal al humano, algunas cepas aEPEC de origen animal pertenecen a serogrupos implicados en enfermedad humana. Esto sugiere que algunos animales podrían constituir un reservorio importante de aEPEC desde donde estas cepas podrían transmitirse al humano⁵.

El serogrupo O157 contiene, además del serotipo O157:H7 (perteneciente al patotipo STEC y asociado a casos de diarrea con o sin sangre y síndrome urémico hemolítico [SUH]), cepas heterogéneas, en general no-H7, algunas de ellas caracterizadas como EPEC².

El objetivo del presente trabajo fue describir el aislamiento de *E. coli* O157:H16 en un caso de diarrea infantil y en sus contactos familiares en General Pico, La Pampa.

En noviembre del 2013, un niño de 2 años fue atendido en la guardia de pediatría del Hospital «Gobernador Centeno» de General Pico, La Pampa, por un cuadro de dolor abdominal, diarrea sanguinolenta y vómitos, de 3 días de evolución. De padres separados, el niño vivía con su madre y 2 hermanos, aunque el padre lo visitaba frecuentemente. El hogar poseía agua corriente y red cloacal. Del interrogatorio

realizado a los padres se pudo inferir que el niño había presentado lesiones cutáneas en manos, pies y boca, que, por las características clínicas de las lesiones descriptas, el médico tratante atribuyó a un virus de tipo *Coxsackie*. Si bien el niño consumía agua de red hervida y tomaba leche en polvo, una semana antes de haber comenzado con las ampollas había ingerido leche de vaca no pasteurizada, pero hervida. Con respecto a alimentos sospechados, relataron haber comido embutidos (tipo salchichas) no hervidos y raviolos durante un viaje a Bahía Blanca. En general, manifestaron consumir carne bien cocida, pero reconocieron utilizar la misma tabla para la preparación de verduras y carnes, y que no hacían una buena separación de los alimentos crudos y cocidos. Los padres no realizaban actividades relacionadas con el campo y no habían estado en contacto con animales o con personas que podrían haber padecido diarrea o SUH.

Durante la consulta, el médico tratante solicitó un coprocultivo. En el laboratorio se realizó un examen directo de la materia fecal, observándose respuesta inflamatoria y hemáties, y la muestra se sembró en medios diferenciales para la búsqueda de *Shigella* spp., *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Aeromonas* spp., *Vibrio cholerae* y *E. coli* O157. A los 11 días de evolución, se tomó una segunda muestra del paciente para seguimiento de la eliminación y se realizó el estudio de contactos familiares, tomándose muestras de materia fecal de la madre, del padre, del hermano de 9 años, de la hermana de 11 meses y de la abuela paterna, quienes durante el interrogatorio refirieron no haber presentado diarrea en los días anteriores. Las muestras fueron enviadas al Laboratorio Nacional de Referencia de SUH e infecciones asociadas a *E. coli*, para completar su caracterización.

Como parte del algoritmo diagnóstico recomendado por la Red Nacional de Diarrea y Patógenos Bacterianos de Transmisión Alimentaria, que indica la detección de STEC en toda diarrea sanguinolenta, la muestra de materia fecal se sembró en agar MacConkey sorbitol (SMAC). De la zona de crecimiento confluyente del SMAC se realizó la extracción de ADN para realizar PCR múltiple (mPCR) para la detección de los genes *stx*₁, *stx*₂ y *rfb*_{O157}⁷.

Por mPCR se detectó una banda de 259 pb correspondiente al gen *rfb*_{O157} y hubo resultado negativo para los genes *stx*₁ y *stx*₂. Asimismo, la muestra fue negativa para todos los otros enteropatógenos ensayados. Los aislamientos *rfb*_{O157}-positivos, confirmados como *E. coli* por pruebas bioquímicas, fueron confirmados por serotipificación con antiseros somáticos y flagelares provistos por el Statens Serum Institute (Copenhage, Dinamarca). El gen *eae* (intimina) fue estudiado por PCR utilizando los oligonucleótidos SK1 y SK2, y el gen *ehxA* (enterohemolisina) se investigó usando los oligonucleótidos hlyA1 y hlyA4. El gen *bfp* fue analizado por PCR de acuerdo a Gunzburg *et al.*⁴. La variante de *eae* fue determinada por RFLP-PCR usando los oligonucleótidos y las condiciones descritas por Ramachandran *et al.*¹¹. La sensibilidad a los antimicrobianos amicacina, ampicilina, ciprofloxacina, cloranfenicol, colistina, gentamicina, ácido nalidíxico, nitrofurantoína, estreptomycin, tetraciclina y trimetoprima-sulfametoxazol fue establecida según el National Committee for Clinical Laboratory Standards. Para la subtipificación de los aislamientos se aplicó la técnica de macrorrestricción con la enzima *Xba*I y separación por electroforesis de campo pulsado (*Xba*I-PFGE), según lo requerido en el protocolo estandarizado por los Centers for Diseases Control and Prevention, Atlanta, EE. UU., para la Red PulseNet. La relación clonal entre los aislamientos se estableció utilizando el software BioNumerics versión 4.61 (Applied Maths, Kortrijk, Bélgica). La detección de toxina libre en materia fecal se realizó por la técnica de citotoxicidad específica en células Vero y neutralización con anticuerpos monoclonales anti-Stx1 y anti-Stx2^{6,13}.

De la primera muestra de materia fecal del paciente y de las muestras de la madre, del padre y de la hermana se aisló *E. coli* O157:H16 *eae*-positivo, variante épsilon (ϵ), fermentador de sorbitol, con actividad de β -glucuronidasa y sensible a todos los antimicrobianos ensayados (fig. 1). La cepa fue negativa para los factores de virulencia *stx*₁, *stx*₂, *ehxA* y *bfp*, correspondiendo a la categoría de EPEC atípico (aEPEC). Todas las muestras fueron negativas para StxMF, salvo la muestra de la abuela, en la que se detectó Stx1/Stx2MF.

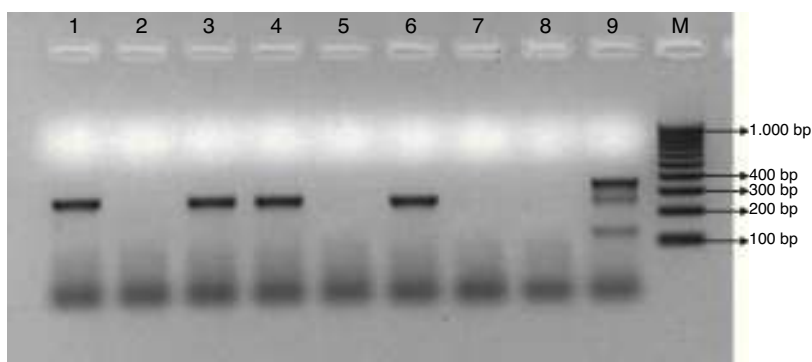


Figura 1 PCR múltiple para la detección de los genes *stx*₁, *stx*₂, y *rfb*_{O157}. Línea 1: aislamiento de *E. coli* de la primera muestra del caso de diarrea; línea 2: zona de crecimiento confluyente en SMAC de la segunda muestra del caso de diarrea; línea 3: aislamiento de *E. coli* de la muestra del padre; línea 4: aislamiento de *E. coli* de la muestra de la madre; línea 5: zona de crecimiento confluyente en SMAC de la muestra del hermano; línea 6: aislamiento de *E. coli* de la muestra de la hermana; línea 7: zona de crecimiento confluyente en SMAC de la muestra de la abuela paterna; línea 8: control de reactivos; línea 9: *E. coli* 110/05 control positivo para *stx*₁ (130 bp), *stx*₂ (346 bp) y *rfb*_{O157} (259 bp).

M: marcador de tamaño molecular Cien Marker.

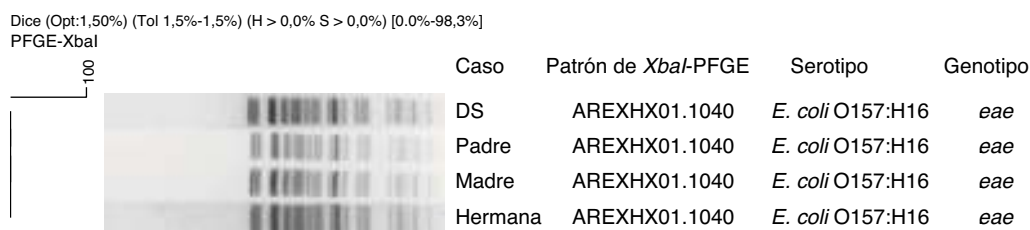


Figura 2 Relación clonal por XbaI-PFGE de las cepas de *Escherichia coli* O157:H16 aisladas de un caso de diarrea sanguinolenta y de sus contactos familiares.

Por XbaI-PFGE, todos los aislamientos presentaron el mismo patrón de macrorrestricción (AREXHX01.1040), con 100% de similitud (fig. 2).

En Argentina, el SUH posentérico es endémico y aproximadamente 400 casos nuevos se notifican anualmente, y más del 70% de los casos de SUH están asociados con la infección por *E. coli* O157¹². En el período 2005-2013, en La Pampa, se notificaron 63 casos de SUH (<http://salud.lapampa.gov.ar>). Estos datos revelan la importancia que tiene, a nivel de país, la vigilancia de las diarreas y la implementación de técnicas sensibles para detección de STEC O157 y no-O157.

Mediante el estudio de un caso de diarrea infantil y su grupo familiar se pudo aislar e identificar *E. coli* O157:H16 *eae*-ε-positivo, *bfp*-negativo y *stx*-negativo, correspondiendo este aislamiento a la categoría de aEPEC. La vigilancia de los contactos asintomáticos permitió comprobar la circulación de esta cepa en el grupo familiar. A través del análisis de tipificación por XbaI-PFGE, se comprobó su similitud genética y se confirmó un brote familiar difuso.

Si bien no se pudo identificar la fuente de contagio, ciertos hábitos de riesgo, como el consumo de leche de vaca no pasteurizada y de embutidos, el uso del mismo utensilio en la elaboración de alimentos o la separación no adecuada de alimentos crudos y cocidos pueden ser considerados como posibles fuentes de infección.

En un estudio realizado por Feng *et al.*² con cepas de aEPEC O157:H16 de distintas fuentes (humano, animal y medio ambiente) provenientes de 6 países (incluyendo Argentina), los autores demostraron que la mayoría de esas cepas portaban el gen *eae*-ε, constituyendo un grupo clonal homólogo, altamente conservado, diseminado a nivel mundial. Filogenéticamente, dichas cepas aparecían distantes de los 2 mayores linajes de *E. coli* enterohemorrágico, los 4 linajes de EPEC y los 3 grupos de *Shigella*.

Bentancor *et al.*¹ detectaron cepas aEPEC O157:H16 en muestras de materia fecal de perros del conurbano bonaerense, y 8/9 (88,9%) portaron el alelo *eae*-ε. Dichas cepas presentaron distintos patrones de XbaI-PFGE con un 74% de similitud. Este estudio mostró que los perros pueden ser portadores de aEPEC O157:H16.

Para prevenir las enfermedades asociadas a *E. coli* O157 es importante conocer las vías de transmisión y educar en forma continua a la población para disminuir los hábitos de riesgo. En cuanto al diagnóstico, la incorporación de técnicas sensibles, como la PCR múltiple, permite el diagnóstico oportuno de STEC O157 y no-O157. Frente a un aislamiento de *E. coli* O157 o no-O157, se debe realizar una adecuada vigilancia epidemiológica. En niños que asisten a jardines maternos, de infantes y escuelas, se recomienda el estudio de contactos institucionales, sintomáticos y asintomáticos, y

no autorizar su reingreso hasta tener 2 coprocultivos negativos con intervalos de 48 h, debido a la excreción prolongada de estos patógenos⁹.

Es importante fortalecer los sistemas de vigilancia e incorporar técnicas de biología molecular para el diagnóstico de todos los patotipos de *E. coli* diarreigénico, integrando los resultados a los datos epidemiológicos, para poder confirmar la relación de los aislamientos e identificar brotes difusos.

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que para esta investigación no se han realizado experimentos en seres humanos ni en animales.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores han obtenido el consentimiento informado de los pacientes y sujetos referidos en el artículo. Este documento obra en poder del autor de correspondencia.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

1. Bentancor A, Vilte DA, Rumi MV, Carbonari CC, Chinen I, Larzábal M, Cataldi A, Mercado EC. Characterization of non-Shigatoxin-producing *Escherichia coli* O157 strains isolated from dogs. *Rev Argent Microbiol.* 2010;42:46-8.
2. Feng PC, Keys C, Lacher DW, Beutin L, Bentancor A, Heuvelink A, Afset JE, Rumi V, Monday S. Clonal relations of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* O157:H16 strains isolated from various sources from several countries. *FEMS Microbiol Lett.* 2012;337:126-31.
3. Gomes TAT, Gonzalez-Pedrajo B. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC). En: Torres AG, editor. *Pathogenic Escherichia coli in Latin America*. Oak Park (IL), Estados Unidos: Bentham Science Publishers; 2010. p. 25-47.
4. Gunzburg ST, Tornieporth NG, Riley LW. Identification of enteropathogenic *Escherichia coli* by PCR-based detection of the bundle-forming pilus gene. *J Clin Microbiol.* 1995;33:1375-7.
5. Hernandez RT, Elias WP, Vieira MAM, Gomes TAT. An overview of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett.* 2009;297:137-49.
6. Karmali MA, Petric M, Lim C, Fleming PC, Arbus GS, Lior H. The association between idiopathic hemolytic uremic syndrome and

- infection by verotoxin-producing *Escherichia coli*. 1985. *J Infect Dis*. 2004;189:556–63.
7. Leotta GA, Chinen I, Epsztein S, Miliwebsky E, Melamed IC, Motter M, Ferrer M, Marey E, Rivas M. Validación de una técnica de PCR múltiple para la detección de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga. *Rev Argent Microbiol*. 2005;37:1–10.
 8. Mansan-Almeida R, Pereira AL, Giugliano LG. Diffusely adherent *Escherichia coli* strains isolated from children and adults constitute two different populations. *BMC Microbiology*. 2013;13:22.
 9. Miliwebsky E, Deza N, Chinen I, Martinez Espinosa E, Gomez D, Pedroni E, Caprile L, Bashckier A, Manfredi E, Leotta G, Rivas M. Prolonged fecal shedding of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* among children attending day-care centers in Argentina. *Rev Argent Microbiol*. 2007;39:90–2.
 10. Neter E, Westphal O, Luderitz O, Gino RM, Gorzynski EA. Demonstration of antibodies against enteropathogenic *Escherichia coli* in sera of children of various ages. *Pediatrics*. 1955;16:801–8.
 11. Ramachandran V, Brett K, Hornitzky MA, Dowton M, Bettelheim KA, Walker MJ, Djordjevic SP. Distribution of intimin subtypes among *Escherichia coli* isolates from ruminant and human sources. *J Clin Microbiol*. 2003;41:5022–32.
 12. Rivas M, Miliwebsky E, Chinen I, Deza N, Leotta G. Epidemiología del síndrome urémico hemolítico en Argentina: diagnóstico del agente etiológico, reservorios y vías de transmisión. *Medicina (Buenos Aires)*. 2006;66:27–32.
 13. Rivas M, Miliwebsky E, Chinen I, Roldán CD, Balbi L, García B, Fiorilli G, Sosa-Estani S, Kincaid J, Rangel J, Griffin PM, the Case-Control Study Group. Characterization and epidemiologic subtyping of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from hemolytic uremic syndrome and diarrhea cases in Argentina. *Foodborne Pathog Dis*. 2006;3:88–96.
 14. Tozzoli R, Grande L, Michelacci V, Ranieri P, Maugliani A, Caprioli A, Morabito S. Shiga toxin-converting phages and the emergence of new pathogenic *Escherichia coli*: A world in motion. *Front Cell Infect Microbiol*. 2014;4:80.
 15. Willians ND, Torres AG, Lloyd SJ. Evolution and epidemiology of diarrheagenic *Escherichia coli*. En: Torres AG, editor. *Pathogenic Escherichia coli in Latin America*. Oak Park (IL), Estados Unidos: Bentham Science Publishers; 2010. p. 8–24.