

Las cepas enterohemorrágicas de «*Escherichia coli*» como paradigma de patógenos emergentes. Lecciones de la gran epidemia de infección alimentaria centrada en Alemania en mayo y junio de 2011

V. Martínez Suárez¹, J. Dalmau Serra², J.V. Martínez-Suárez³

¹Centro de Salud El Llano (Gijón). Servicio de Salud del Principado de Asturias. ²Unidad de Nutrición y Metabolopatías. Hospital Infantil «La Fe». Valencia. ³Departamento de Tecnología de Alimentos. Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA). Ministerio de Educación y Ciencia. Madrid

Resumen

Las cepas enterohemorrágicas de *Escherichia coli* (EHEC) son patógenos zoonóticos de transmisión alimentaria asociados a epidemias y a casos esporádicos de diarrea y colitis hemorrágica, cuadros que pueden complicarse y dar lugar al síndrome hemolítico urémico (HUS). La importancia de las cepas EHEC se debe a la gravedad del HUS, que es la causa más frecuente de insuficiencia renal aguda en los niños en América y Europa. *E. coli* O157:H7 es el serotipo fundamental del patotipo EHEC. Ya hace años se predijo que cepas EHEC de otros serotipos podrían convertirse en importantes patógenos transmitidos por alimentos, y desde entonces estos microorganismos se han relacionado con numerosos casos de enfermedad en todo el mundo. La incidencia de estos serotipos distintos del O157:H7 sigue creciendo, lo que significa que pueden considerarse patógenos emergentes. Un ejemplo reciente es el gran brote de infecciones transmitidas por los alimentos y causadas por EHEC O104:H4, que se centró principalmente en Alemania durante mayo y junio de 2011. La cepa responsable del brote posee una combinación de factores de virulencia típicos de diferentes patotipos de *E. coli*, lo que corrobora que la plasticidad de los genomas bacterianos facilita la emergencia de nuevos patógenos especialmente virulentos. Las investigaciones epidemiológicas identificaron el origen del brote en una partida de semillas de alholva (fenogreco) importadas de Egipto en 2009. La dimensión internacional de esta epidemia ilustra la urgente necesidad de mejorar la vigilancia epidemiológica de las cepas EHEC.

©2012 Ediciones Mayo, S.A. Todos los derechos reservados.

Palabras clave

Enfermedad alimentaria, seguridad microbiológica alimentaria, *Escherichia coli* productora de toxina Shiga, síndrome hemolítico urémico

Abstract

Title: Enterohaemorrhagic strains of *Escherichia coli* as a paradigm of emerging pathogens. Lessons from the large outbreak of foodborne infections centred in Germany throughout May and June of 2011

Enterohaemorrhagic strains of *Escherichia coli* (EHEC) are foodborne zoonotic pathogens associated with major outbreaks and sporadic cases of diarrhoea and haemorrhagic colitis or bloody diarrhea, which can progress to the hemolytic uremic syndrome (HUS). The importance of EHEC lies in the severity of HUS, which is the most frequent cause of acute renal failure in children in the Americas and Europe. It was predicted years ago that EHEC strains other than the prototypic O157:H7 serotype would emerge as significant foodborne pathogens. Since then, these microorganisms have been linked to numerous outbreaks and sporadic cases of disease around the world. The incidence of these serotypes continues to grow, which means they can be considered emerging pathogens. A recent example is the large outbreak of foodborne infections caused by EHEC O104:H4, which was mainly centred in Germany lasting throughout May and June of 2011. The outbreak strain shows a combination of virulence factors from different *E. coli* pathotypes, highlighting the way in which the plasticity of bacterial genomes facilitates the emergence of new highly virulent pathogens. Epidemiologic investigations traced the origin of the outbreak to fenugreek seeds imported from Egypt in 2009. The international dimension of the outbreak illustrated the urgent need for improving the epidemiologic surveillance of EHEC.

©2012 Ediciones Mayo, S.A. All rights reserved.

Keywords

Foodborne disease, microbial food safety, emerging pathogens, Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, hemolytic uremic syndrome

Introducción

Las enfermedades emergentes de transmisión alimentaria son un desafío para los sistemas de salud pública y casi siempre un gran reto asistencial. Sabemos que la seguridad microbiológica de los alimentos es un problema dinámico y sujeto a la influencia de numerosos factores a lo largo de toda la cadena alimentaria, desde la granja o las pesquerías hasta la mesa. En concreto, las poblaciones de patógenos más relevantes para la seguridad alimentaria no son estáticas, y pueden evolucionar y utilizar distintos alimentos como vehículos para colonizar nuevos huéspedes¹. Ello explica que la epidemiología de las enfermedades transmitidas por los alimentos haya cambiado en las últimas décadas, no sólo por la aparición de nuevos patógenos, sino por los cambios que han tenido lugar en el suministro de alimentos y por un aumento de la población con mayor susceptibilidad a estas enfermedades².

Nuevos patógenos alimentarios

El espectro de las infecciones transmitidas por los alimentos ha variado, ya que algunos patógenos tradicionales han sido controlados o eliminados, mientras que otros agentes desconocidos, muchos de ellos transmitidos desde reservorios animales, han surgido como nuevos patógenos humanos¹. Las enfermedades emergentes se han descrito como aquellas cuya prevalencia ha aumentado en las últimas décadas y que previsiblemente seguirá haciéndolo en un futuro próximo². Por tanto, un patógeno emergente no tiene por qué haber surgido recientemente, y se acepta que microorganismos clásicos transmitidos por alimentos, como *Salmonella* spp. y las cepas enteropatógenas de *Escherichia coli*, pueden evolucionar hacia un mayor poder patógeno y aprovechar nuevas situaciones favorables a su difusión y al desarrollo de infecciones. Por ejemplo, pueden contaminar alimentos que no eran considerados de riesgo, como las verduras frescas, y causar nuevos problemas de salud pública, como la resistencia a antibióticos. Tanto *E. coli* O157:H7 como las cepas de *Salmonella* resistentes a antibióticos, ambas comensales en el ganado vacuno, son ejemplos de agentes patógenos que se han desarrollado como tales hace relativamente poco tiempo³.

Estos nuevos patógenos pueden surgir debido a la transferencia genética de factores de virulencia que se encuentran en regiones del ADN cromosómico, conocidas como «islas de patogenicidad», que pueden ser compartidas entre diferentes microorganismos⁴. La promiscuidad genética que permite que estos genes sean adquiridos por una bacteria se relaciona con la presencia de una serie de elementos genéticos móviles, como plásmidos, transposones, transposones conjugativos y bacteriófagos⁴. Hoy sabemos que la adquisición de esos elementos y su integración en el genoma bacteriano desempeñan un papel fundamental en la aparición y la evolución de nuevas cepas de un microorganismo. De esa forma, *E. coli* O157:H7 evolucionó a partir de un ancestro enteropatógeno del serotipo O55:H7 a través de la transferencia horizontal y la recombinación de distintos genes⁵.

En otros casos, los nuevos patógenos aparecen debido a cambios ecológicos o tecnológicos que ponen a un microorganismo potencialmente infeccioso en contacto con la cadena alimentaria. Algunos ejemplos relativamente recientes de patógenos asociados a los alimentos como vehículos de enfermedad y relacionados con cambios ambientales incluyen *Listeria monocytogenes*, *Cryptosporidium parvum* y *Cyclospora cayotensis*. Muchos de estos patógenos humanos son zoonóticos: tienen un reservorio animal, pero no causan necesariamente enfermedad en el animal³.

Las cepas enterohemorrágicas de «Escherichia coli» como paradigma de los agentes patógenos emergentes

Escherichia coli es una de las especies bacterianas comensales del intestino humano, aunque existe un grupo de cepas de esta especie que causan diferentes enfermedades. Estas cepas se clasifican en función de la enfermedad que originan y de sus factores de virulencia particulares⁶. Entre los principales patotipos causantes de diarrea se encuentran *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) y *E. coli* enteroinvasora (EIEC). Estos cuatro grupos han sido implicados en enfermedades causadas por alimentos o agua contaminada⁶.

Las cepas EHEC son patógenos zoonóticos de transmisión alimentaria asociados a epidemias y a casos esporádicos de diarrea y colitis hemorrágica (HC), que destacan entre el resto de los patógenos alimentarios porque un número pequeño pero significativo de las personas infectadas desarrolla el síndrome hemolítico urémico (HUS), que es la causa más frecuente de insuficiencia renal aguda en los niños en América y Europa^{7,8}.

Las cepas EHEC son un subgrupo del grupo de cepas de *E. coli* que producen toxinas de tipo Shiga (Stx), también denominadas verocitotoxinas (VT), por lo que el patotipo se denomina indistintamente STEC o VTEC. Hay muchos serotipos de STEC, pero sólo los que han sido clínicamente asociados a casos de HC se designan como EHEC. De éstos, el serotipo O157:H7 es el prototipo de EHEC y el implicado más frecuentemente en la enfermedad en todo el mundo⁹. El resto de serotipos comparten los principales factores de virulencia de este serotipo, y también se encuentran con frecuencia en el ganado vacuno sano y en otros rumiantes, causando enfermedades poco perceptibles o inaparentes en estos reservorios animales⁹. Las heces que contienen estos microorganismos actuarían como fuente de contaminación de diferentes alimentos y del ambiente¹⁰. Aunque *E. coli* O157:H7 se estudia como uno de los principales parámetros de la seguridad de los alimentos, no está claro si todos los aislados de *E. coli* O157 de origen animal son igual de dañinos para los seres humanos. Y en contraposición, el potencial patogénico de los serotipos de STEC diferentes al O157 se pasa a menudo por alto¹¹. Por tanto, resulta difícil la distinción entre las cepas EHEC y las cepas STEC no asociadas a enfermedad y que pueden no ser patógenas¹². Para detectar las cepas EHEC de serotipos diferentes al O157:H7, es preciso emplear

métodos moleculares basados en la identificación de los factores de virulencia y/o sus genes^{6,11}.

Hace años se predijo que las cepas STEC de otros serotipos diferentes al O157:H7 se podrían convertir en importantes patógenos transmitidos por alimentos. Desde entonces, estos microorganismos se han vinculado a numerosos brotes epidémicos y casos esporádicos de enfermedades alimentarias en todo el mundo³, y la incidencia de estos serotipos sigue creciendo, lo que significa que pueden considerarse patógenos emergentes¹². Un ejemplo reciente es el gran brote de infecciones transmitidas por los alimentos causadas por EHEC O104:H4, que tuvo lugar en mayo y junio de 2011. Se centró principalmente en el norte de Alemania, pero afectó también a otros 13 países europeos, así como a Estados Unidos y Canadá^{13,14}. El serotipo O104:H4 sólo se había detectado anteriormente asociado a un pequeño número de infecciones en humanos, pero hasta la fecha no se ha detectado en animales ni en alimentos. En el brote de 2011, el número total de casos de infección por STEC en Europa fue de 3.910 (941 confirmados y 2.969 probables), incluyendo 782 casos de HUS (264 confirmados y 518 probables) y 46 muertes (29 debidas al HUS)¹⁵. Estas cifras representan la mayor epidemia de EHEC que se ha descrito hasta ahora en el mundo en cuanto al número de casos de HUS se refiere.

Respecto a la patogenia de la infección por EHEC, se sabe que es multifactorial e involucra varios niveles de interacción entre la bacteria y el huésped. Las cepas EHEC portan un conjunto de genes de virulencia que codifican los factores de unión a las células del huésped, la síntesis de moléculas efectoras y la producción de diferentes toxinas. Aunque los factores de virulencia de los diferentes patotipos de *E. coli* normalmente no se superponen, hay un número creciente de estudios que describen el aislamiento de cepas de *E. coli* asociadas a enfermedades humanas que contienen nuevas combinaciones de factores de virulencia^{11,12}.

Como integrantes del grupo STEC, la facultad de las cepas EHEC de originar enfermedad en los seres humanos se relaciona con su capacidad de expresar los diferentes tipos de Stx (Stx1 y Stx2, y distintas variantes de Stx2). La toxina Stx puede alcanzar el torrente sanguíneo y ligarse a los receptores específicos de la glucoproteína Gb3 en las células del propio intestino, del glomérulo y, ocasionalmente, de otros órganos vitales, como el cerebro. Se sabe que la unión de Stx en el glomérulo es heterogénea debido a las variaciones de expresión de la Gb3 en su interior¹⁶, lo que condiciona su internalización y la subsecuente inhibición de la síntesis proteica. El resultado es un daño y muerte celular variables, con separación más o menos extensa del epitelio de su membrana basal y un amplio espectro en su presentación clínica.

Las cepas EHEC pueden considerarse también un subgrupo del patotipo EPEC, ya que tienen la capacidad de fijarse y producir lesiones en el epitelio intestinal, característica de las cepas EPEC (lesiones de adhesión y destrucción localizada, o *attaching and effacing* [A/E] *lesions*). Esta capacidad de las cepas EHEC de originar lesiones en el intestino después de la ingestión también está vinculada a la enfermedad en los seres humanos⁶.

Lecciones de la epidemia europea de 2011 causada por EHEC O104:H4

La epidemia europea de 2011 causada por EHEC O104:H4 ha sido inusual, por presentar diferencias clínicas y microbiológicas importantes respecto a otros grandes brotes previos, principalmente los de STEC O157:H7¹⁷.

En el mes de mayo ya se observó que la frecuencia de HUS era más alta de lo habitual, demostrándose además que la cepa EHEC O104:H4 poseía un plásmido de virulencia típico de otro patotipo diferente al EHEC, las cepas enteroagregantes de *E. coli* (EAEC), lo cual también resultaba insólito¹⁸.

En el mes de junio ya se había obtenido la secuencia del genoma completo de nueve aislados diferentes de la bacteria, y se llevó a cabo su análisis comparativo, haciéndose públicos los resultados inmediatamente^{18,19}. Las secuencias corroboraron que el cromosoma de esta cepa de *E. coli* O104:H4 es similar al de las cepas de tipo EAEC, pero además contiene el gen *stx2* ligado a un bacteriófago integrado en el cromosoma. Así, los genes que permitirían a esta cepa colonizar el intestino humano no proceden del patotipo EPEC, como ocurre normalmente, sino del grupo de cepas EAEC^{18,19}. Por tanto, la cepa responsable del brote posee una combinación de factores de virulencia típicos de dos patotipos diferentes de *E. coli* (las cepas EHEC y EAEC). El grupo EAEC es probablemente la causa bacteriana más común de diarrea, pero no se identifica en la mayoría de los laboratorios de diagnóstico. Las cepas EAEC se agregan para adherirse fuertemente a los enterocitos, por lo que perduran en el intestino más tiempo que otros patotipos. Ello explicaría por qué la cepa de EHEC O104:H4 es más virulenta que las cepas EHEC clásicas.

Los estudios de genómica comparada mostraron que este clon de 2011 no era completamente nuevo, sino una ligera variante de cepas conocidas que tienen un fondo genético similar típico de las cepas EAEC, aunque han adquirido la capacidad de producir Stx. Pero la cepa de 2011 contiene genes cromosómicos y plasmídicos adicionales que la diferencian de las demás, como genes de virulencia típicos de patotipos extraintestinales de *E. coli* y genes de resistencia a diferentes antibióticos. Ello sugiere que es una variante relativamente nueva, y que adquirió el fago con el gen *stx2* y la resistencia a antibióticos hace 10 o 20 años¹⁸⁻²⁰. La transferencia genética horizontal sería responsable de la emergencia de esta cepa EH(EA)EC especialmente virulenta, lo que corrobora que la plasticidad de los genomas bacterianos facilita la emergencia de nuevos patógenos⁴.

La publicación a las pocas semanas del inicio del brote de la secuencia completa del genoma del microorganismo responsable es un buen ejemplo de la aplicación de la tecnología de secuenciación de ADN de última generación para el análisis de los brotes epidémicos de este tipo de infecciones en tiempo real. Con el rápido intercambio nacional e internacional de información y de cepas, los datos conocidos fueron inmediatamente evaluados en el marco de una colaboración global sin precedentes¹⁹.

Los resultados sobre las características genéticas de la cepa responsable del brote no sólo ayudaron en el diagnóstico rápi-

do y preciso de los pacientes, sino que también permitieron la investigación del origen y las vías de transmisión de la enfermedad. Con gran rapidez, se aplicaron nuevas herramientas de análisis y diagnóstico para detectar la cepa en las muestras clínicas y en alimentos. Así, tres días después de obtener el primer aislado se desarrolló y publicó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) multiplex específica que, junto con una novedosa PCR en tiempo real, permitió el reconocimiento y la identificación de la cepa en los alimentos^{17,18}.

Las investigaciones epidemiológicas identificaron el origen del brote en una partida de semillas de alholva (fenogreco) importadas de Egipto en 2009, aunque no se consiguió aislar la cepa responsable de ninguna de las muestras de semillas analizadas²¹. El tiempo transcurrido y la amplia distribución de las semillas por todo el mundo impiden saber dónde se encuentran y durante cuánto tiempo permanecerán a la venta, lo que hace patente la gran complejidad de la producción y la distribución de alimentos a escala global¹⁷.

Esta epidemia de dimensiones internacionales muestra la urgente necesidad de mejorar la vigilancia epidemiológica de las cepas EHEC. Para ello, es necesario desarrollar herramientas de diagnóstico rápido y flexible para detectar en los alimentos todas las EHEC, y no centrarse sólo en *E. coli* O157:H7¹⁸. La mejora de los métodos para la identificación de posibles EHEC emergentes es una de las principales enseñanzas de esta epidemia.

La extensión y la complejidad de esta epidemia también nos advierten de la importancia de la colaboración de todos los niveles de las redes de salud pública para reconocer el brote, identificar y caracterizar el agente causal, encontrar los vehículos de transmisión y controlar la infección. La puesta en funcionamiento de estas redes debe basarse en la participación multidisciplinaria (técnicos de salud, expertos en seguridad veterinaria y alimentaria, sanitarios y gestores, e investigadores de centros públicos y privados) y multipatógeno (bancos informativos)²¹⁻²³. Ello resulta esencial para hacer un seguimiento de las tendencias de cambio de enfermedades, ya bien conocidas, y detectar los patógenos emergentes; en suma, para desarrollar programas de prevención eficaces y estrategias de control. ■

Bibliografía

- Newell DG, Koopmans M, Verhoef L, Duizer E, Aidara-Kane A, Sprong H, et al. Food-borne diseases: the challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. *Int J Food Microbiol*. 2010; 139 Supl 1: 3-15.
- Altekruse SF, Swerdlow DL. The changing epidemiology of food-borne diseases. *Am J Med Sci*. 1996; 311: 23-29.
- Blackburn C de W, McClure P J. Foodborne pathogens: hazards, risk analysis and control, 2.^a ed. Oxford: Woodhead Publishing, 2009.
- Ahmed N, Dobrindt U, Hacker J, Hasnain SE. Genomic fluidity and pathogenic bacteria: applications in diagnostics, epidemiology and intervention. *Nat Rev Microbiol*. 2008; 6: 387-394.
- Feng P, Lampel KA, Karch H, Whittam TS. Genotypic and phenotypic changes in the emergence of *Escherichia coli* O157:H7. *J Infect Dis*. 1998; 177: 1.750-1.753.
- Feng P, Weagant SD. Bacteriological analytical manual, 2011. Chapter 4A. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Disponible en: <http://www.fda.gov/food/scienceresearch/laboratorymethods/bacteriologicalanalyticalmanualbam/ucm070080.htm>
- Karmali MA, Gannon V, Sargeant JM. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC). *Vet Microbiol*. 2010; 140: 360-370.
- Pennington H. *Escherichia coli* O157. *Lancet*. 2010; 376: 1.428-1.435.
- Ferens WA, Hovde CJ. *Escherichia coli* O157:H7: animal reservoir and sources of human infection. *Foodborne Pathog Dis*. 2011; 8: 465-487.
- Rotariu O, Ogden ID, Macritchie L, Forbes KJ, Williams AP, Cross P, et al. Combining risk assessment and epidemiological risk factors to elucidate the sources of human *E. coli* O157 infection. *Epidemiol Infect*. 2011; 27: 1-16.
- Lefebvre B, Diarra MS, Moisan H, Malouin F. Detection of virulence-associated genes in *Escherichia coli* O157 and non-O157 isolates from beef cattle, humans, and chickens. *J Food Prot*. 2008; 71: 1.774-1.784.
- Mathusa EC, Chen Y, Enache E, Hontz L. Non-O157 STEC in foods. *J Food Prot*. 2010; 73: 1.721-1.736.
- Frank C, Werber D, Cramer JP, Askar M, Faber M, Van der Heiden M, et al; HUS Investigation Team. Epidemic profile of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 outbreak in Germany. *N Engl J Med*. 2011; 365: 1.771-1.780.
- Robert Koch Institute. Informationen zum EHEC/HUS-Ausbruchsgeschehen-Ende des Ausbruchs [Information about the EHEC/HUS-outbreak-end of the outbreak] 2011. Disponible en: http://www.rki.de/clin_117/nn_467482/DE/Content/InfAZ/E/EHEC/Info-HUS,tempelateld=raw,property=publicationFile.pdf/Info-HUS.pdf15
- European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC): update on outbreak in the EU 2011 (27 July 2011, 11:00). Disponible en: <http://ecdc.europa.eu/en/activities/sciadvise>
- Chark D, Nutikka A, Trusevych N. Differential carbohydrate epitope recognition of globotriaosil ceramide by verotoxins and a monoclonal antibody. *Eur J Biochem*. 2004; 271: 405-417.
- Bielaszewska M, Mellmann A, Zhang W, Köck R, Fruth A, Bauwens A, et al. Characterisation of the *Escherichia coli* strain associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, 2011: a microbiological study. *Lancet Infect Dis*. 2011; 11: 671-676.
- Scheutz F, Nielsen EM, Frimodt-Møller J, Boisen N, Morabito S, Tozzoli R, et al. Characteristics of the enteroaggregative Shiga toxin/verotoxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 strain causing the outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, May to June 2011. *Euro Surveill*. 2011; 16 pii: 19.889.
- Mellmann A, Harmsen D, Cummings CA, Zentz EB, Leopold SR, Rico A, et al. Prospective genomic characterization of the German enterohemorrhagic *Escherichia coli* O104:H4 outbreak by rapid next generation sequencing technology. *PLoS One*. 2011; 6: e22751.
- Mellmann A, Bielaszewska M, Köck R, Friedrich AW, Fruth A, Middendorf B, et al. Analysis of collection of hemolytic uremic syndrome-associated enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis*. 2008; 14: 1.287-1.290.
- European Food Safety Authority. Tracing seeds, in particular fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) seeds, in relation to the Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) O104:H4 2011 outbreaks in Germany and France. European Food Safety Authority, 2011. Disponible en: <http://www.efsa.europa.eu/en/supporting/doc/176e.pdf>
- Lahuerta A, Westrell T, Takkinen J, Boelaert F, Rizzi V, Helwig B, et al. Zoonoses in the European Union: origin, distribution and dynamics: the EFSA-ECDC summary report 2009. *Euro Surveill*. 2011; 16 pii: 19.832.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet) 2011: FoodNet surveillance report for 2010. Disponible en: <http://www.cdc.gov/foodnet/reports.htm>