

Informe técnico de laboratorio:

Subtipificación molecular de cepas de *Escherichia coli* productoras de toxina Shiga (STEC), 2015.

Resumen



Entre marzo y diciembre de 2015 el Centro Nacional de Referencia de Bacteriología del Inciensa recibió seis cepas de *Escherichia coli* productoras de toxina Shiga (STEC) aisladas de muestras de heces de pacientes pediátricos con diarrea. Debido a que los aislamientos clínicos de STEC se consideran poco frecuentes en Costa Rica y aunado a la necesidad de conocer la diversidad genética de esos aislamientos, las cepas fueron caracterizadas por metodologías moleculares (reacción en cadena de la polimerasa – PCR y electroforesis de campo pulsado - PFGE). Los estudios moleculares evidenciaron una amplia diversidad genética entre los microorganismos, además de un predominio de cepas de *E. coli* portadoras de los genes de la intimina y de la toxina STX1.

Informe técnico de laboratorio

Subtipificación molecular de cepas de *Escherichia coli* productoras de toxina Shiga (STEC).

Elaborado por:

Dr. Francisco Duarte Martínez

Centro Nacional de Referencia en Inocuidad Microbiológica de Alimentos

Antecedentes.

Se estima que las cepas de *Escherichia coli* productoras de la toxina Shiga (conocidas como STEC) producen en los Estados Unidos más de 265 000 casos de enfermedad al año, con más de 3 600 hospitalizaciones y aproximadamente 30 defunciones ⁽¹⁾. Las infecciones por STEC suelen causar diarrea, algunas veces sanguinolenta y entre 5 y 10 % de los pacientes podrían desarrollar síndrome urémico hemolítico (SUH) y complicaciones severas e incluso fatales tales como fallo renal, anemia hemolítica y trombocitopenia ⁽²⁾. La transmisión de STEC ocurre por el consumo de alimentos y agua contaminados, por contacto directo con personas infectadas (p. ej. en guarderías) o por el contacto con animales y su ambiente. Varios serogrupos de STEC han sido asociados a brotes de enfermedades transmitidas por alimentos de gran magnitud ⁽¹⁾. Entre ellos figura como el más frecuente el serogrupo O157 y son de importancia también los serogrupos O26, O45, O103, O111, O121 y O145.

Durante el año 2015 el Laboratorio Clínico del Hospital Nacional de Niños (HNN) refirió para confirmación al Centro Nacional de Referencia de Bacteriología (CNRB) del Inciensa, seis cepas de *Escherichia coli* portadoras de genes codificantes para la toxina Shiga, aisladas de muestras de heces de pacientes pediátricos con diarrea.

En este informe se resume la caracterización serológica y molecular de los aislamientos de STEC referidas por el HNN durante el 2015. Se incluye además la información clínico-epidemiológica contenida en las boletas de solicitud de análisis.

Metodología.

- La detección de los factores de virulencia *stx1*, *stx2* y del serogrupo O157 se realizó según el PCR multiplex descrito por Leota *et al.* La determinación del gen *eae A* se realizó según Karch *et al.*
- La determinación de los serogrupos O26, O45, O103, O111, O121 y O145 se llevó a cabo en colaboración con Laboratorio Nacional de Servicios Veterinarios (LANASEVE–SENASA, MAG) utilizando el método para detección de STEC por BAX Q7 system de DuPont.
- La determinación del serogrupo O104 se realizó por aglutinación en lámina en el CNRB.
- Debido a que los aislamientos de STEC referidos al CNRB se consideran poco frecuentes, cinco cepas se analizaron por metodologías moleculares (electroforesis de campo pulsado - PFGE) para determinar si se encontraban relacionadas genéticamente. La PFGE, se llevó a cabo según el protocolo estandarizado para la subtipificación de *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* sp. y

Shigella sonnei de la Red de Subtipificación Molecular para la Vigilancia de Enfermedades Transmitidas por Alimentos PulseNet América Latina y Caribe.

Resultados.

En el Cuadro 1 se resume la información demográfica de los pacientes y de los factores de virulencia, así como los marcadores moleculares y fenotípicos caracterizados para cada cepa.

Las cepas referidas fueron aisladas de cuatro niños y dos mujeres. De los afectados, un paciente era menor de un año de edad, tres tenían edades entre uno y cuatro años y dos eran del grupo etario entre cinco y nueve años. Cuatro de los casos se presentaron en la provincia de San José, uno en Heredia y otro en Cartago. Los casos se presentaron en diferentes meses, entre marzo y diciembre del 2015. En el CNRB no se cuenta con la información necesaria que indique la evolución de los pacientes posterior a la infección con STEC.

Ninguna de las cepas caracterizadas pertenecía al serogrupo O157; solo se logró determinar el serotipo para una de ellas como O145. Cuatro de las cepas eran portadoras de los genes *stx1* y *eae*, una era portadora de los genes *stx2* y *eae* y una de ellas solo poseía el gen *stx1*.

Cuadro 1: Cepas de STEC referidas por el Hospital Nacional de Niños durante el año 2015.

DATOS DE LA CEPA		Datos del paciente			Serogrupo (PCR)	Resultados de los análisis realizado en INCIENSA			
# Muestra Inciensa	Mes	Sexo	Grupo etario (años)	Provincia de residencia		<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eaeA</i>	<i>rfbO157</i>
411369	marzo	M	5 - 9	San José	O145	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
414882	abril	F	1 - 4	San José	No corresponde a los serogrupos O157, O26, O103, O45, O111, O121, ni O145	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
416384	mayo	M	5 - 9	Heredia	No corresponde a los serogrupos O157, O26, O103, O45, O111, O121, ni O145	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
418774	junio	F	1 - 4	San José	No corresponde a los serogrupos O157, O26, O103, O45, O104, O111, O121, ni O145	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
423230*	julio	M	1 - 4	Cartago	No corresponde al serogrupo O157	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
431609	diciembre	M	< 1	San José	No corresponde a los serogrupos O157, O26, O103, O45, O111, O121, ni O145	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo

* Esta cepa no se analizó por PFGE

Al ser analizadas por PFGE los aislamientos mostraron coeficientes de similitud genética que variaron desde el 66 % hasta el 88 % (Figura 1). Al realizar la consulta en la base de datos regional de PulseNet América Latina y Caribe no se encontraron cepas de STEC con patrones de restricción similares.

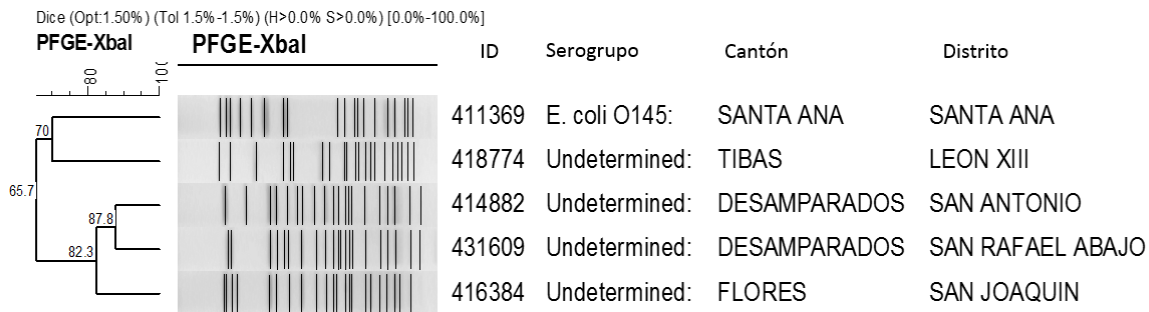


Figura 1. Árbol de relación genética para STEC no O157 aisladas en el año 2015. Los perfiles de restricción se obtuvieron utilizando la enzima XbaI. El método de construcción corresponde a UPGMA utilizando el coeficiente de Dice.

Conclusión.

A excepción de un aislamiento que se confirmó como STEC O145, los cinco restantes no pertenecían a los serogrupos más importantes descritos en la literatura (O157, O26, O103, O45, O111, O121, ni O145). Además, no se demostró relación genética entre los cinco aislamientos analizados por PFGE, por lo que se puede concluir que los casos no se encuentran relacionados entre sí. Se evidenció también una elevada diversidad genética en cuanto a los perfiles electroforéticos, lo que podría deberse a la exposición de diversas fuentes de contaminación. Al respecto es importante mencionar que en Inciensa no se dispone de información sobre los vehículos probables de infección de estos pacientes, ni se recibieron muestras de alimentos sospechosos para su análisis.

Recomendaciones finales.

Se recomienda continuar la vigilancia laboratorial de STEC para identificar aislamientos epidemiológicamente relevantes y su posible relación genética. De igual manera es importante que se realice la investigación epidemiológica oportuna de estos casos para identificar posibles casos relacionados, identificar vehículos probables de infección y referir los alimentos sospechosos para su análisis microbiológico al Inciensa.

Se recomienda además vigilar el Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) a nivel hospitalario, ya que representa una de las principales complicaciones asociadas a las infecciones por STEC. Actualmente en el Inciensa no se dispone de información suficiente para determinar si se han presentado casos de SUH asociados a las infecciones por STEC confirmadas en el 2015.

Para el manejo de pacientes con diarrea en cuyas heces se aislen STEC vale la pena recalcar que se debe:

- Evitar el uso de antibióticos y anti-diarreicos, considerados factores de riesgo en la evolución de la diarrea a SUH.
- Realizar hemograma y química sanguínea para monitorear su función renal del paciente.
- Valorar la necesidad de referir al paciente a infectología y nefrología.
- Recolectar dos coprocultivos control (con 72 h de diferencia) y referirlos al Inciensa para su procesamiento y estudio por este agente infeccioso.
- Recomendar que el paciente no visite lugares hacinados (viviendas, jardines de infantes, entre otros), hasta no tener dos coprocultivos negativos en un lapso de 72 h.
- Insistir en las medidas de higiene personal (importante el manejo y descarte de pañales, así como el lavado de manos) por parte del personal de salud y el núcleo familiar.
- Realizar la investigación epidemiológica correspondiente para determinar si se trata de un caso aislado o de un brote y tratar de identificar el vehículo probable de infección. En este último caso recolectar muestras de heces de los pacientes y de los alimentos sospechosos para referirlas a la mayor brevedad al Inciensa. Además se deben obtener muestra de heces de los contactos y familiares cercanos del paciente (con o sin diarrea) y referirlas al CNRB-Inciensa para ser estudiados por este agente.

Referencias bibliográficas

1. Centers for Disease and Prevention (CDC). National Shiga toxin producing *Escherichia coli* (STEC) Surveillance Overview. [Monografía en Internet]. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Service, 2012. [acceso 20 de mayo de 2016]. Disponible en: <http://www.cdc.gov/ncezid/dfwed/PDFs/national-stec-surveillance-overview-508c.pdf>
2. Karch *et al.* Clonal Structure and pathogenicity of Shiga-Like toxin-producing, sorbitol fermenting *Escherichia coli* O157:H-. JCM. 1993; 31:1200-1205.
3. Leota *et al.* Validación de una técnica de PCR múltiple para la detección de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga. Revista Argentina de Microbiología. 2005, 37:1-10.
4. Thorpe, C. Shiga Toxin—Producing *Escherichia coli* Infection. Clin Infect Dis. 2004, 38 (9):1298-1303.doi: 10.1086/383473

Este informe es complemento de los reportes individuales de laboratorio que se enviaron oportunamente al Hospital Nacional de Niños, a la región correspondiente a la provincia de residencia del paciente y a la Dirección de Vigilancia de la Salud del Ministerio de Salud.