

Caracterización genotípica y *biofilms* de *E. coli* shigatoxigénica aisladas de casos clínicos humanos

► María Emilia Cáceres^{1a*}, Claudio Marcelo Zotta^{2b}, Silvina Lavayén^{3b}, Analía Etcheverría^{4a}, Nora Lía Padola^{4a}

¹ Licenciada en Tecnología de Alimentos.

² Técnico Químico.

³ Licenciada en Química.

⁴ Médica Veterinaria.

^a Laboratorio de Inmunoquímica y Biotecnología. Facultad de Ciencias Veterinarias. CIVETAN-CONICET-CICPBA. Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, Tandil, Provincia de Buenos Aires, Argentina.

^b Instituto Nacional de Epidemiología "Dr. Juan H. Jara" (INE) – Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud (ANLIS) "Dr. Carlos G. Malbrán". Departamento Laboratorio. Servicio Bacteriología. Mar del Plata, Provincia de Buenos Aires, Argentina.

* Autora para correspondencia.

Resumen

Escherichia coli shigatoxigénica (STEC) está involucrada en el desarrollo del síndrome urémico hemolítico, entre otras enfermedades que son de gran importancia para la salud pública e inocuidad alimentaria a nivel mundial. La capacidad de STEC de formar *biofilms* en los alimentos y en diferentes superficies podría conducir a la contaminación cruzada por el desprendimiento de las células bacterianas. El objetivo del presente trabajo fue detectar la presencia de genes que codifican factores de adherencia mediante la técnica de PCR y determinar la capacidad de formación de *biofilms* por medio de cultivo en microplacas de poliestireno de 96 pocillos y la técnica de cristal violeta, en cepas de STEC aisladas de muestras clínicas humanas en la ciudad de Mar del Plata, Argentina. El perfil de genes de adherencia más frecuente fue *efa1*, *iha*, *fimCD*, *ehaA*, *lpfA1-3*, *lpfA2-2*, *cah* (43,9%). Todas las cepas de STEC formaron *biofilms* con valores de densidad óptica entre 0,209 y 3,251 y el 54,4% (31/57) de las mismas fueron clasificadas como fuertes formadoras de *biofilms*. La capacidad de formación de *biofilms* de STEC constituye un riesgo evidente en la transmisión de este patógeno al ser humano a tener en cuenta para su vigilancia y control.

Palabras clave: *Escherichia coli* shigatoxigénica; Síndrome urémico hemolítico; *Biofilms*; Factores de adherencia

Genotypic characterization and biofilms of shigatoxigenic E. coli isolated from human clinical cases

Abstract

Shigatoxigenic Escherichia coli (STEC) is involved in the development of hemolytic uremic syndrome, among other diseases that are relevant to public health and food safety worldwide. The ability of STEC to form biofilms in food and on different surfaces could lead to cross-contamination by shedding bacterial cells. The aim of this work was to detect the presence of genes encoding adherence factors by the PCR technique and to determine the biofilm formation ability by culture in 96-well polystyrene microplates and the crystal violet technique, in STEC strains isolated from human clinical samples in Mar del Plata city, Argentina. The most frequent adherence gene profile was efa1, iha, fimCD, ehaA, lpfA1-3, lpfA2-2, cah (43.9%). All STEC strains formed biofilms with optical density values between 0.209

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957 (impresa)

ISSN 1851-6114 (en línea)

ISSN 1852-396X (CD-ROM)

and 3.251. Also, the 54.4% (31/57) of STEC strains were classified as strong biofilm formers. The ability of STEC to form biofilms constitutes an evident risk in the transmission of this pathogen to humans, which must be taken into account for its surveillance and control.

Keywords: Shigatoxigenic *Escherichia coli*; Hemolytic uremic syndrome; Biofilms; Adherence factors

Caracterização genotípica e biofilmes de *E. coli* shigatoxigênica isolados de casos clínicos humanos

Resumo

A *Escherichia coli* shigatoxigênica (STEC) está envolvida no desenvolvimento da síndrome hemolítica urêmica, entre outras doenças relevantes para a saúde pública e segurança alimentar em todo o mundo. A capacidade do STEC de formar biofilmes nos alimentos e em diferentes superfícies poderia levar à contaminação cruzada através do desprendimento de células bacterianas. O objetivo do presente trabalho foi detectar a presença de genes que codificam fatores de aderência através da técnica PCR e determinar a capacidade de formação de biofilme por cultura em microplacas de poliestireno de 96 poços e da técnica de cristal violeta, em cepas STEC isoladas de amostras clínicas humanas na cidade de Mar del Plata, Argentina. O perfil de genes de aderência mais frequente foi *efa1*, *iha*, *fimCD*, *ehaA*, *lpfA1-3*, *lpfA2-2*, *cah* (43,9%). Todas as cepas de STEC formaram biofilmes com valores de densidade óptica entre 0,209 e 3,251. Também, os 54,4% (31/57) das estirpes STEC foram classificados como fortes formadores de biofilmes. A habilidade de formação de biofilmes de STEC constitui um risco evidente na transmissão deste patógeno ao humano, que deve ser levado em consideração para sua vigilância e controle.

Palavras-chave: *Escherichia coli* shigatoxigênica; Síndrome hemolítica urêmica; Biofilmes; Fatores de aderência

Introducción

El síndrome urémico hemolítico (SUH) es una enfermedad que está ampliamente distribuida en el mundo. En la Argentina, el SUH es endémico y se presenta con una de las tasas de incidencia más altas a nivel mundial (1). El SUH se caracteriza por síntomas como falla renal aguda, trombocitopenia, y anemia hemolítica microangiopática (2). En la Argentina constituye la primera causa de insuficiencia renal aguda en pediatría y la segunda de insuficiencia renal crónica y, además, es responsable del 20% de los trasplantes renales en niños y adolescentes. Se producen entre 300 y 400 casos nuevos por año con un importante subregistro (1). La enfermedad no tiene un tratamiento específico pues el tratamiento con antibióticos está contraindicado (3).

Uno de los microorganismos mayormente asociados al SUH es *Escherichia coli* productor de toxina Shiga o shigatoxigénica (STEC), un patógeno emergente de gran importancia para la salud pública y la inocuidad alimentaria a nivel mundial. Las infecciones con STEC van desde diarrea acuosa, colitis hemorrágica hasta el SUH (4). Usualmente, STEC afecta en mayor medida a niños menores de 5 años, personas adultas mayores y pacientes inmunocomprometidos (4).

La transmisión de esta bacteria a los seres humanos puede ocurrir por el consumo de alimentos contaminados en los diferentes procesos de la cadena productiva (fundamentalmente carne, leche y otros subproductos del ganado bovino) (5), aunque también puede producirse por la vía fecal-oral, persona-a-persona o por el contacto directo con los animales. Los rumiantes son descritos como el principal reservorio, pero la transmisión puede también ocurrir a través de otras especies domésticas, mamíferos salvajes, aves y peces (6). Por otro lado, el consumo de agua contaminada, los natatorios (7) (8) y el consumo de productos frescos y legumbres han emergido como responsables de importantes brotes de SUH en varios países (9) (10).

Más de 150 serotipos de STEC han sido descritos asociados con brotes e infecciones humanas esporádicas. O157:H7 es el serotipo que se encuentra en mayor proporción en pacientes con SUH en la Argentina (1) (11) (12). Sin embargo, el número de infecciones asociadas a STEC no-O157 se ha incrementado en los últimos años y otros serotipos como O26:H11, O103:H2, O111:NM y O113:H21 O145:NM han sido implicados como causantes de enfermedad humana severa (13). Este escenario trae consigo nuevos desafíos para el diagnóstico y el control de este patotipo tanto en el ambiente de la salud pública como en la industria de los alimentos.

La patogenicidad de STEC está asociada con varios factores de virulencia, entre los que se incluyen principalmente la producción de la toxina Shiga (*stx1*, *stx2*), esenciales para características patogénicas y secuelas de la infección (2). Además, puede producir una enterohemolisina (EHEC-Hly) codificada por el gen *ehxA* que podría contribuir a la enfermedad mediante la lisis de los eritrocitos y la liberación de hemoglobina como fuente potencial de hierro para las bacterias. Por otra parte, dado que un paso importante para la patogénesis es la adherencia al intestino del hospedador, STEC puede secretar una proteína de membrana externa llamada intimina, codificada por el gen *eae* que se encuentra localizado en la isla de patogenicidad LEE (del inglés, *locus of enterocyte effacement*); esta proteína favorece la adherencia íntima de las bacterias a los enterocitos y la destrucción de microvellosidades (“*attaching and effacing*”, A/E) (14). En las cepas *eae*-negativas se han identificado varias proteínas con función de adherencia, algunas de las cuales están codificadas en una nueva isla de patogenicidad llamada *locus* de adhesión y autoagregación (LAA) (15) (16) (17). Se han descrito, además, otros factores de colonización del hospedador como, por ejemplo: una proteína homóloga a IrgA (*iha*) que confiere adherencia y permite la unión a células epiteliales en un patrón difuso (18), un factor de adherencia de *E. coli* enterohemorrágica (*efa1*) implicado en la colonización intestinal de terneros (19) y fimbrias como la fimbria tipo 1 (*fim*) y la fimbria curli (*crI*) que contribuyen a la adhesión al hospedador a las superficies abióticas y a la formación de *biofilms* (20) (21) y la fimbria larga polar (*lpf*) que participa en la adhesión a las células epiteliales y la colonización (22). En STEC se han descrito varias proteínas pertenecientes a la familia de proteínas autotransportadas (AT), como el antígeno 43 (*agn43*), el homólogo del antígeno 43 de unión al calcio (*cah*) (15) (16) y la proteína autotransportada de EHEC (*ehaA*) (23), que promueven la autoagregación celular, la adhesión a superficies y la formación de *biofilms*. Se considera que, bajo condiciones ambientales adecuadas, todos los microorganismos son capaces de vivir bajo la forma de *biofilms* o biopelículas, que se definen como comunidades de microorganismos embebidos en una matriz de exopolisacáridos y adheridos a una superficie inerte o un tejido vivo (24). Las bacterias que crecen dentro del *biofilm* tienen diferencias en la tasa de crecimiento y en la transcripción de genes con respecto a sus contrapartes planctónicas (24). Este estilo de vida contribuye a aumentar la supervivencia frente a condiciones adversas del entorno natural, procedimientos de desinfección y terapias con antibióticos (25) (26). La capacidad de STEC de formar *biofilms* en los alimentos y en diferentes superficies podría conducir a la contaminación cruzada por el desprendimiento de las células bacterianas, lo que constituye un riesgo para la salud (27) (28), razón por la cual resulta rele-

vante el estudio de la formación de *biofilms* por parte de estos patógenos (29).

Dada la importancia de STEC para la salud pública y el riesgo de la formación de *biofilms* para su transmisión, el objetivo del presente trabajo fue detectar la presencia de genes que codifican factores de adherencia y determinar la capacidad de formación de *biofilms* en cepas de STEC aisladas de muestras clínicas humanas en la ciudad de Mar del Plata.

Materiales y Métodos

Cepas bacterianas

Se utilizaron 57 cepas de STEC aisladas entre los años 1996 y 2013 de pacientes con diarrea sanguinolenta (n=9), de casos de SUH (n=40) y de sus contactos asintomáticos convivientes (n=8), atendidos en la ciudad de Mar del Plata, Argentina. Las cepas provienen de la vigilancia microbiológica para este microorganismo que, a nivel local, realiza desde el año 1996 el laboratorio del Instituto Nacional de Epidemiología “Dr. Juan H. Jara” (INE)-Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud “Dr. Carlos G. Malbrán” de la ciudad de Mar del Plata. Las características de las cepas utilizadas en este estudio se muestran con más detalle en la Tabla I.

Factores genéticos de adherencia

En el Laboratorio de Inmunoquímica y Biotecnología de la Facultad de Ciencias Veterinarias (UNCPBA, CIVETAN-CONICET, Tandil), las cepas fueron reactivadas en 5 mL de caldo LB durante 18 h a 37 °C. Se tomaron 10 µL de cultivo que fueron sometidos a ebullición en 500 µL de agua bidestilada para la extracción del ADN. Los siguientes genes que codifican para factores de adherencia y colonización -*efa*, *iha*, *fimCD*, *ehaA*, *agn43*, *cah*, *lpfA1-3* y *lpfA2-2*- fueron detectados mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa PCR (16) (18) (19) (21) (22) (23). Dichos genes formaron parte de un proyecto de investigación que se realizó en el Laboratorio y son algunos de los más utilizados en la caracterización de cepas de STEC. Los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa (2%), con tinción con bromuro de etidio.

Formación de *biofilms*

La capacidad de formar *biofilms* se estimó mediante cultivo en microplacas de poliestireno de 96 pocillos (Corning, Thermo Fisher Scientific) utilizando la técnica de cristal violeta (CV) según Cáceres, *et al.* (30). Brevemente, se realizó una dilución 1:100 del cultivo *overnight* de cada cepa y una alícuota (10 µL) fue sembrada en pocillos que contenían 190 µL de LB.

Tabla 1. Caracterización genotípica y formación de biofilms de STEC aisladas de pacientes con SUH, de contactos asintomáticos de SUH (CA#SUH) y de pacientes con diarrea sanguinolenta (DS) atendidos en la ciudad de Mar del Plata en los años 1996-2013 (n=57). Se muestra la DO ajustada (DOa) de cada cepa por una DO de corte (DOc=0,193). Las cepas fueron clasificadas de acuerdo a la DOa en: fuertes (FFB), moderadas (MFB) y débiles (DFB) formadoras de biofilms.

Caso	Serotipo	Perfil de virulencia	Genes asociados con la adherencia y la formación de <i>biofilms</i>								Formación de <i>biofilms</i>	
			efa1	iha	fimCD	ehxA	lpfA1-3	lpfA2-2	agn43	cah	DOa	Clasificación
DS	O103:H2	<i>stx1, eae, ehxA</i>	+	-	+	+	-	-	-	+	1,431	FFB
SUH	O121:H19	<i>stx2, eae, ehxA</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	3,104	FFB
CA#SUH	O121:H19	<i>stx2, eae, ehxA</i>	+	+	+	+	-	-	-	+	0,899	FFB
SUH	O121:H19	<i>stx2, eae, ehxA</i>	+	-	+	+	-	-	-	-	0,656	MFB
SUH	O121:H19	<i>stx2, eae, ehxA</i>	+	+	+	+	-	-	+	-	1,159	FFB
DS	O145:NM	<i>stx2, eae, ehxA</i>	+	+	+	+	-	-	-	+	0,767	MFB
CA#SUH	O145:NM	<i>stx2, eae, ehxA</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	0,911	FFB
SUH	O145:NM	<i>stx2, eae, ehxA</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	1,262	FFB
SUH	O145:NM	<i>stx2, eae, ehxA</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	0,282	DFB
SUH	O145:NM	<i>stx2, eae, ehxA</i>	+	+	+	+	-	-	-	+	0,272	DFB
SUH	O145:NM	<i>stx2, eae, ehxA</i>	+	+	+	+	-	-	-	+	0,361	DFB
SUH	O145:NM	<i>stx2, eae, ehxA</i>	-	+	+	-	-	-	+	+	2,719	FFB
SUH	O145:NM	<i>stx2, eae, ehxA</i>	+	+	+	+	-	-	-	+	0,529	MFB
DS	O26:H21	<i>stx1, eae, ehxA</i>	+	+	+	+	-	-	+	+	0,899	FFB
DS	ONT:HNT	<i>stx1, eae, ehxA</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	0,329	DFB
CA#SUH	ONT:NM	<i>stx1, ehxA</i>	-	+	+	-	-	-	+	+	2,301	FFB
CA#SUH	ONT:NM	<i>stx2, eae, ehxA</i>	-	+	+	+	-	-	-	+	3,251	FFB
CA#SUH	OR:H7	<i>stx2, ehxA</i>	-	+	+	-	-	-	-	+	1,110	FFB
CA#SUH	O157:H7	<i>stx2, eae, ehxA</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	1,909	FFB
CA#SUH	O157:H7	<i>stx2, eae, ehxA</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	0,689	MFB
CA#SUH	O157:H7	<i>stx2, eae, ehxA</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	1,959	FFB
DS	O157:H7	<i>stx2, eae, ehxA</i>	+	+	+	+	-	-	+	+	1,909	FFB
DS	O157:H7	<i>stx2, eae, ehxA</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	0,323	DFB
DS	O157:H7	<i>stx2, eae, ehxA</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	0,980	FFB
DS	O157:H7	<i>stx2, eae, ehxA</i>	+	-	+	+	+	+	-	+	1,453	FFB
DS	O157:H7	<i>stx2, eae, ehxA</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	0,566	MFB
SUH	O157:H7	<i>stx2, eae, ehxA</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	2,185	FFB
SUH	O157:H7	<i>stx2, eae, ehxA</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	1,255	FFB
SUH	O157:H7	<i>stx2, eae, ehxA</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	1,338	FFB
SUH	O157:H7	<i>stx2, eae, ehxA</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	1,362	FFB
SUH	O157:H7	<i>stx2, eae, ehxA</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	1,637	FFB
SUH	O157:H7	<i>stx2, eae, ehxA</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	0,362	DFB
SUH	O157:H7	<i>stx2, eae, ehxA</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	1,064	FFB
SUH	O157:H7	<i>stx2, eae, ehxA</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	0,779	MFB
SUH	O157:H7	<i>stx2, eae, ehxA</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	0,960	FFB
SUH	O157:H7	<i>stx2, eae, ehxA</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	0,655	MFB
SUH	O157:H7	<i>stx2, eae, ehxA</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	0,743	MFB

Tabla I. Continuación

Caso	Serotipo	Perfil de virulencia	Genes asociados con la adherencia y la formación de <i>biofilms</i>								Formación de <i>biofilms</i>	
			<i>efa1</i>	<i>iha</i>	<i>fimCD</i>	<i>ehaA</i>	<i>lpfA1-3</i>	<i>lpfA2-2</i>	<i>agn43</i>	<i>cah</i>	DOa	Clasificación
SUH	O157:H7	<i>stx2, eae, ehxA</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	0,633	MFB
SUH	O157:H7	<i>stx2, eae, ehxA</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	0,484	MFB
SUH	O157:H7	<i>stx2, eae, ehxA</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	0,673	MFB
SUH	O157:H7	<i>stx2, eae, ehxA</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	1,059	FFB
SUH	O157:H7	<i>stx1, stx2, eae, ehxA</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	0,735	MFB
SUH	O157:H7	<i>stx2, eae, ehxA</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	0,810	FFB
SUH	O157:H7	<i>stx2, eae, ehxA</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	0,303	DFB
SUH	O157:H7	<i>stx2, eae, ehxA</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	0,789	FFB
SUH	O157:H7	<i>stx2, eae, ehxA</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	0,309	DFB
SUH	O157:H7	<i>stx2, eae, ehxA</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	0,874	FFB
SUH	O157:H7	<i>stx2, eae, ehxA</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	2,492	FFB
SUH	O157:H7	<i>stx2, eae, ehxA</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	1,663	FFB
SUH	O157:H7	<i>stx2, eae, ehxA</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	0,934	FFB
SUH	O157:H7	<i>stx2, eae, ehxA</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	0,308	DFB
SUH	O157:H7	<i>stx2, eae, ehxA</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	0,710	MFB
SUH	O157:H7	<i>stx2, eae, ehxA</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	0,209	DFB
SUH	O157:H7	<i>stx2, eae, ehxA</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	0,376	DFB
SUH	O157:H7	<i>stx2, eae, ehxA</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	0,511	MFB
SUH	O157:H7	<i>stx2, eae, ehxA</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	1,128	FFB
SUH	O157:H7	<i>stx2, eae, ehxA</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	0,467	MFB

Las placas se incubaron estáticamente durante 48 h a 37 °C con una intervención a las 24 h donde se retiraron los sobrenadantes de los pocillos y se reemplazaron por LB suplementado con glucosa al 0,5%. Los pocillos se tiñeron con 200 µL de CV al 0,1% durante 20 min. El colorante adherido a las biopelículas se eluyó con alcohol al 96% y se leyó la densidad óptica (DO₅₇₀) en un lector de microplacas *Labsystem Multiscan EX* (I.C.T, S.L. Instrumentación Científica Técnica, S.L.).

Análisis estadísticos

Para cada cepa se utilizaron tres pocillos consecutivos y se previeron tres pocillos control sembrados con medio de cultivo estéril. Las DO se promediaron y se ajustaron (DOa) mediante una DO de corte (DOc) (suma del promedio de DO de los pocillos de control y tres veces su desviación estándar). De acuerdo con la DOa, las cepas se clasificaron en 4 categorías: no formadora de *biofilm* (NFB) (DOa < DOc); débil formadora

de *biofilm* (DFB) (DOc ≤ DOa < 2DOc); moderada formadora de *biofilm* (MFB) (2DOc ≤ DOa < 4DOc) y fuerte formadora de *biofilm* (FFB) (DOa > 4DOc) según Gómez, *et al.* (31). Se realizó el análisis descriptivo de variables en estudio y de asociación de las mismas mediante el uso de los paquetes estadísticos informatizados EpiInfo™ 7.2 y EpiDat 3.1.

Resultados

Caracterización genotípica de factores de adherencia

Entre los genes asociados a la adherencia y la formación de *biofilms*, el gen *fimCD* se presentó con mayor frecuencia (55/57; 96,5%), seguido por los genes *iha* y *ehaA* (52/57; 91,2% cada uno), *efa1* (51/57; 89,5%) y *lpfA1-3*, *lpfA2-2* y *cah* presentes en el 66,7% de las cepas (38/57). El gen *agn43* fue el que se detectó en menor proporción (5/57; 8,8%) (Tabla I).

Todos los aislados de STEC O157:H7 recuperados de casos de SUH (n=32) fueron positivos para los genes *efa1*, *iha*, *fimCD* y *ehaA*. Los genes *lpfA1-3* y *lpfA2-2*, sólo fueron detectados en 38/40 cepas O157:H7 y en un aislamiento O145:HNM. En las cepas STEC *cae*-negativas, ONT:NM y OR:H7 solo fueron detectados los genes *iha*, *fimCD* y *cah* (Tabla I). Se encontraron distintos perfiles de adherencia, entre los cuales el más frecuente fue *efa1*, *iha*, *fimCD*, *ehaA*, *lpfA1-3*, *lpfA2-2*, *cah*, presente en el 43,9% de las cepas, seguido de *efa1*, *iha*, *fimCD*, *ehaA*, *lpfA1-3*, *lpfA2-2* presente en el 21,1% de las cepas de STEC analizadas (Fig. 1).

Formación de *biofilms*

Se evidenció la capacidad de producción de *biofilms* en el total de las cepas estudiadas, y se obtuvieron valores de DO entre 0,209 y 3,251. Según la regla de clasificación utilizada, el 54,4% (31/57) de las cepas fue FFB, el 26,3% (15/57) MFB y el 19,3% (11/57) resultó DFB (Fig. 2). Ninguna cepa resultó clasificada como NFB. Los datos correspondientes a las DOa obtenidas para cada cepa se muestran en la Tabla I.

Cuando se agruparon las cepas en STEC O157 y no-O157 y se relacionaron con la capacidad de for-

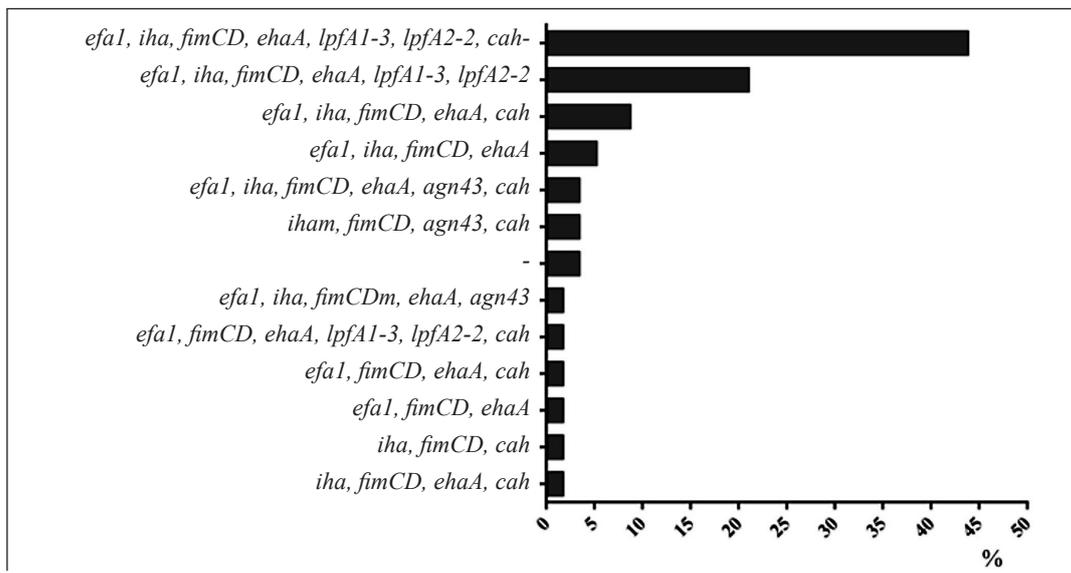


Figura 1. Distintos perfiles de genes de adherencia detectados en STEC proveniente de casos clínicos de humanos. Se muestran los porcentajes (%) de detección sobre el eje de las x y los distintos perfiles de genes de adherencia y formación de *biofilms* sobre el eje de las y. Dos de las cepas, una O157:H7 y O121:H19 no presentaron ningún gen.

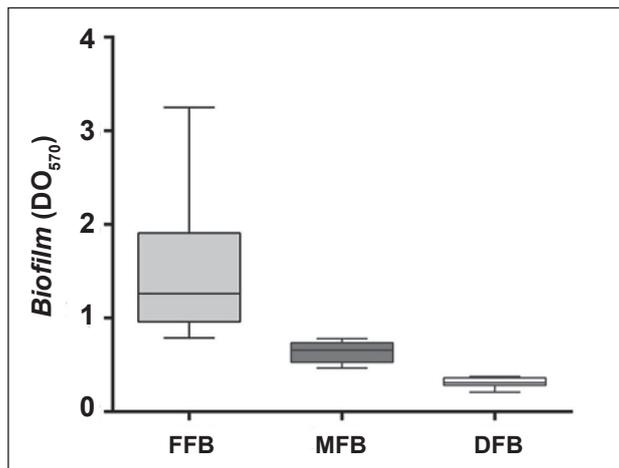


Figura 2. Clasificación de STEC según su capacidad de formación de *biofilms*. Las cepas se clasificaron en fuertes (FFB), moderadas (MFB) y débiles (DFB) formadoras de *biofilms* de acuerdo a una DO ajustada por una DOc=0,193. Se muestran los valores máximos, medio y mínimo para cada categoría.

mación de *biofilms*, no se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas al comparar las distintas capacidades entre ambos subgrupos: FFB ($p=0,489$), MFB ($p=0,261$) y DFB ($p=0,704$).

Discusión y Conclusiones

STEC se encuentra altamente asociado al SUH y a otras enfermedades; el serotipo O157:H7 es el más implicado en enfermedades, aunque en los últimos años se han aislado serotipos de STEC no-O157 de casos y brotes esporádicos de diarrea y SUH (32). La capacidad de STEC de formar *biofilms* en los alimentos o en diferentes superficies, podría conducir a la contaminación cruzada y a la transmisión del patógeno desde el medio ambiente hasta el ser humano provocando enfermedad. Por eso, este trabajo estuvo orientado a la caracterización genética de cepas STEC aisladas de casos clínicos de la ciudad de Mar del Plata y a la evaluación de su capacidad de formar *biofilms*.

El 96,5% de las cepas STEC eran portadoras del gen *eae* asociado a la producción de intimina y en la mayoría se detectó la presencia de uno o más de los genes codificantes de factores de adherencia y colonización: *efa*, *iha*, *fimCD*, *ehaA*, *agn43*, *cah*, *lpfA1-3* y *lpfA2-2*. Estos genes codifican proteínas implicadas en la adherencia y la autoagregación celular necesarias para colonizar al hospedador y formar *biofilms* (33) (34).

Se observó que un gran porcentaje de cepas *eae*-positivas fueron también positivas para *efa1* (89,5%), lo que coincide con otros estudios donde *efa1* se ha detectado en cepas aisladas de bovinos, humanos y alimentos en su mayoría *eae*-positivas (23) (35) (36) y no así en cepas de STEC *eae*-negativas (33) (36). Por otro lado, *iha* se detectó en el 91,2% de las cepas, independientemente de la presencia o ausencia de *eae*. En varios trabajos previos, este gen se observó ampliamente distribuido entre diferentes patotipos de *E. coli*-STEC, enteropatogénica (EPEC) y uropatogénica (UPEC)- (18) (37) (38), entre distintos orígenes (bovinos, humanos o de alimentos) (35), e independientemente de los serogrupos (39) y de la presencia o ausencia de *eae* (40).

Los genes *fimCD* y *ehaA* fueron detectados en un gran porcentaje de las cepas (96,5 y 91,2%, respectivamente). Estos genes participan tanto en la adherencia a superficies (*fimCD*) como en la autoagregación celular necesaria para la formación de *biofilms* (*ehaA*) (21) (41). La fimbria larga polar (LP) se ha identificado primeramente en *E. coli* O157:H7 y está implicada en la interacción de la bacteria con las células eucariotas y la formación de microcolonias (42). Las variantes *lpfA1-3* y *lpfA2-2* utilizadas en este estudio, que fueron detectadas en diferentes cepas de *E. coli* *eae*-positivas, son específicas del linaje O157:H7 y no se han encontrado en otros serotipos de STEC, independientemente de la fuente

de aislamiento o de su asociación con la enfermedad (33) (43). En concordancia con estos hallazgos, todas las cepas O157:H7 analizadas en este trabajo resultaron positivas para estos genes; sin embargo, llamativamente, una cepa O145:HNM también resultó positiva.

Las proteínas Antígeno 43 (Agn43) y Cah median la adherencia de las bacterias a líneas celulares, la autoagregación y la formación de *biofilms* en distintos materiales vivos e inertes, bajo distintos medios y formas de cultivo (34) (44) (45). En este estudio se detectó una mayor presencia de *cah* que de *agn43*, especialmente entre las cepas O157:H7 y O145:HNM, dos de los serotipos más asociados a enfermedad grave en seres humanos. La proteína Cah es homóloga al Agn43 por lo que cumplirían funciones parecidas; por su parte, el Agn43 se sintetiza durante casos de enfermedad humana, lo que sugiere que desempeña un papel importante en el desarrollo del SUH (15) (16). Si bien la sola presencia o ausencia de los genes no puede explicar la habilidad para producir *biofilms* o generar enfermedad (46), los genes de adherencia detectados en este estudio se asociarían al potencial virulento de estas cepas circulantes en la región, mientras que los genes detectados asociados a la formación de *biofilms* indicarían la capacidad de subsistencia de estos microorganismos en el medio ambiente.

Por otra parte, todas las cepas de STEC estudiadas fueron capaces de formar *biofilms* en las condiciones brindadas, y más del 50% de las mismas resultaron ser fuertes formadoras de *biofilms*, según la clasificación empleada. La distinta capacidad de formación de *biofilms* de STEC O157 y no-O157 no arrojó diferencias estadísticamente significativas entre ambos subgrupos. Otros autores han encontrado diferencias en la capacidad de formar *biofilms* según el origen, como el caso de lo descrito por Biscola, *et al.* (46), donde aislados provenientes de ganado, de alimentos o de agua resultaron mejores formadoras de *biofilms* que aquellos obtenidos de casos clínicos humanos. En otros casos se ha diferenciado por el serotipo o la presencia o ausencia de *eae*. Se observó que algunos serogrupos *eae*-negativos, como O113 y O91, exhibieron el mayor potencial de formación de *biofilms* frente a otros, incluido O157:H7 (27); y que serotipos *eae*-positivos como O111:NM y O145:NM, han demostrado menor capacidad formadora de *biofilms* en poliestireno (47). Esta diversidad y variabilidad de resultados sumados a los expuestos en este trabajo reafirman que esta capacidad de formar *biofilms* es fuertemente dependiente de la cepa y de las condiciones más que del serotipo o el perfil genético (48).

El propósito de este estudio fue aportar el conocimiento de las potenciales capacidades virulentas de cepas STEC como agentes etiológicos circulantes en la población de Mar del Plata, a través de la detección de genes que posibilitan la colonización del hospedador y la formación de *biofilms*. Se concluye que el potencial patogénico infectante de estas cepas, representado fun-

damentalmente por la capacidad de producción de la toxina Shiga, se vería acompañado por la presencia de genes codificantes de proteínas asociadas a la adherencia y colonización en el hospedador, como así también por la capacidad de subsistencia en el medio ambiente a través de la formación de *biofilms*. La preocupación por STEC como un problema de inocuidad alimentaria se ve agravada por la inexistencia de una inmunización o tratamiento de acción sobre las infecciones por este patotipo en los seres humanos. Por ello se considera muy importante continuar con los estudios relacionados a los mecanismos que subyacen la colonización y formación de *biofilms* y la realización de actividades educativas para la comunidad sobre los vehículos de transmisión y prevención de STEC.

Agradecimientos

Los autores agradecen a María R. Ortiz, del Laboratorio de Inmunoquímica y Biotecnología (UNCPBA, Tandil, Buenos Aires, Argentina) por su asistencia técnica.

Fuentes de financiación

Este trabajo fue financiado por PICT 2015/2666, PICT 2013/1749 y SECAT, UNCPBA.

Conflictos de intereses

Los autores declaran no tener conflictos de intereses respecto del presente trabajo.

Correspondencia

Dra. MARÍA EMILIA CÁCERES
Instituto de Investigaciones en Microbiología y Parasitología Médica (IMPAM)
Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas - Universidad de Buenos Aires
Correo electrónico: mariaemic.tandil@gmail.com

Referencias bibliográficas

- Boletín integrado de vigilancia BIV 560, SE 30 (2020), págs. 59-68. Disponible en: <https://bancos.salud.gob.ar/recurso/boletin-integrado-de-vigilancia-n560-se-302021> (Fecha de acceso 10 de febrero de 2022).
- Karmali MA. Prospects for preventing serious systemic toxemic complications of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections using Shiga toxin receptor analogues. *J Infect Dis* 2004; 189: 355-9.
- Del Cogliano ME, Hollmann A, Martinez M, Semorile L, Ghiringhelli PD, Maffía PC, *et al.* Cationic antimicrobial peptides inactivate Shiga toxin-encoding bacteriophages. *Front Chem* 2017; 5: 122.
- Karmali MA, Gannon V, Sargeant JM. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC). *Vet Microbiol* 2010; 140 (3-4): 360-70.
- Menge C. The role of *Escherichia coli* Shiga toxins in STEC colonization of cattle. *Toxins* 2020; 12 (9): 607.
- Persad AK, Lejeune JT. Animal reservoirs of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. En: Sperandio V, Hovde CJ, editors. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* and other Shiga toxin-producing *E. coli*. Washington, DC: American Society of Microbiology; 2015. p. 231-44.
- Launders N, Byrne L, Adams N, Glen K, Jenkins C, Tubin-Delic D, *et al.* Outbreak of Shiga toxin-producing *E. coli* O157 associated with consumption of watercress, United Kingdom, August to September 2013. *Euro Surveill* 2013; 18: 20624.
- Luna-Gierke RE, Griffin PM, Gould LH, Herman K, Bopp CA, Strockbine N, *et al.* Outbreaks of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection: USA. *Epidemiol Infect* 2014; 142 (11): 2270-80.
- Beutin L, Martin A. Outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) O104:H4 infection in Germany causes a paradigm shift with regard to human pathogenicity of STEC strains. *J Food Prot* 2012; 75 (2): 408-18.
- Rivas M, Chinen I, Miliwebsky E, Masana M. Risk factors for Shiga toxin-producing *Escherichia coli*-associated human diseases. En: Sperandio V, Hovde CJ, editors. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* and other Shiga toxin-producing *E. coli*. Washington, DC: American Society of Microbiology; 2015. p. 381-402.
- Rivero MA, Passucci JA, Rodríguez EM, Parma AE. Role and clinical course of verotoxigenic *Escherichia coli* infections in childhood acute diarrhea in Argentina. *J Med Microbiol* 2010; 59 (3): 345-52.
- Oderiz S, Leotta GA, Galli L. Detección y caracterización de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga en niños atendidos en un hospital pediátrico interzonal de la ciudad de La Plata. *Rev Argent Microbiol* 2018; 50 (4): 341-50.
- Wang F, Yang Q, Kase JA, Meng J, Clotilde LM, Lin A, *et al.* Current trends in detecting non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in food. *Foodborne Pathog Dis* 2013; 10 (8): 665-77.
- Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 2004; 2 (2): 123-40.
- Montero D, Orellana P, Gutiérrez D, Araya D, Salazar JC, Prado V, *et al.* Immunoproteomic analysis to identify Shiga toxin-producing *Escherichia coli* outer membrane proteins expressed during human infection. *Infect Immun* 2014; 82 (11): 4767-77.
- Montero DA, Velasco J, Del Canto F, Puente JL, Padola NL, Rasko DA, *et al.* Locus of Adhesion and Autoaggregation (LAA), a pathogenicity island present in emerging Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains. *Sci Rep* 2017 Aug 1; 7 (1): 7011.
- Vélez MV, Colello R, Etcheverría AI, Vidal RM, Montero DA, Acuña P, *et al.* Distribution of Locus of Adhesion and Autoaggregation and *hes* gene in STEC strains from countries of Latin America. *Curr Microbiol* 2020; 77: 2111-7.

18. Szalo IM, Goffaux F, Pirson V, Piérard D, Ball H, Mainil J. Presence in bovine enteropathogenic (EPEC) and enterohaemorrhagic (EHEC) *Escherichia coli* of genes encoding for putative adhesins of human EHEC strains. *Res Microbiol* 2002; 153 (10): 653-8.
19. Nicholls L, Grant TH, Robins-Browne RM. Identification of a novel genetic locus that is required for *in vitro* adhesion of a clinical isolate of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* to epithelial cells. *Mol Microbiol* 2000; 35 (2): 275-88.
20. Bokranz W, Wang X, Tschäpe H, Römling U. Expression of cellulose and curli fimbriae by *Escherichia coli* isolated from the gastrointestinal tract. *J Med Microbiol* 2005; 54 (12): 1171-82.
21. Cookson AL, Cooley WA, Woodward MJ. The role of type 1 and curli fimbriae of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* in adherence to abiotic surfaces. *Int J Med Microbiol* 2002; 292 (3-4): 195-205.
22. Torres AG, Blanco M, Valenzuela P, Slater TM, Patel SD, Dahbi G, *et al.* Genes related to long polar fimbriae of pathogenic *Escherichia coli* strains as reliable markers to identify virulent isolates. *J Clin Microbiol* 2009; 47 (8): 2442-51.
23. Wu Y, Hinenoya A, Taguchi T, Nagita A, Shima K. Distribution of virulence genes related to adhesins and toxins in Shiga-toxin producing *Escherichia coli* strains isolated from healthy cattle and diarrheal patients in Japan. *J Vet Med Sci* 2010; 72 (5): 589-97.
24. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15 (2): 167-93.
25. Bae YM, Baek SY, Lee SY. Resistance of pathogenic bacteria on the surface of stainless steel depending on attachment form and efficacy of chemical sanitizers. *Int J Food Microbiol* 2012; 153 (3): 465-73.
26. Di Domenico EG, Farulla I, Prignano G, Gallo MT, Vespaziani M, Cavallo I, *et al.* Biofilm is a major virulence determinant in bacterial colonization of chronic skin ulcers independently from the multidrug resistant phenotype. *Int J Mol Sci* 2017; 18 (5): 1077.
27. Wang J, Stanford K, McAllister TA, Johnson RP, Chen J, Hou H, *et al.* Biofilm formation, virulence gene profiles, and antimicrobial resistance of nine serogroups of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Foodborne Pathog Dis* 2016; 13 (6): 316-24.
28. Bumunang EW, Ateba CN, Stanford K, McAllister TA, Niu YD. Biofilm formation by South African non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* on stainless steel coupons. *Can J Microbiol* 2020; 66 (4): 328-36.
29. Vogeeler P, Tremblay YD, Mafu AA, Jacques M, Harel J. Life on the outside: role of biofilms in environmental persistence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Front Microbiol* 2014; 5: 317.
30. Cáceres ME, Etcheverría AI, Padola NL. Efectos del medio de cultivo y métodos de crecimiento en la formación de *biofilm* de 2 cepas de *Escherichia coli* diarregénica. *Rev Argent Microbiol* 2019; 51 (3): 208-13.
31. Gómez J, Gómez-Lus ML, Bas P, Ramos C, Cafini F, Maestre JR, Prieto J *et al.* ¿Es la cuantificación del *biofilm* un elemento diferenciador en la patogenia de bacilos gram-negativos? *Rev Esp Quimioter* 2013; 26 (2): 97-102.
32. Gould LH, Mody RK, Ong KL, Clogher P, Cronquist AB, Garman KN, *et al.* Increased recognition of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in the United States during 2000-2010: epidemiologic features and comparison with *E. coli* O157 infections. *Foodborne Pathog Dis* 2013; 10 (5): 453-60.
33. Galli L, Miliwebsky E, Irino K, Leotta G, Rivas M. Virulence profile comparison between LEE-negative Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains isolated from cattle and humans. *Vet Microbiol* 2010; 143 (2-4): 307-13.
34. Carter MQ, Brandl MT, Kudva IT, Katani R, Moreau MR, Kapur V. Conditional function of autoaggregative protein Cah and common *cah* mutations in Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 2018; 84 (1): e01739-17.
35. Toma C, Espinosa EM, Song T, Miliwebsky E, Chinen I, Iyoda S, *et al.* Distribution of putative adhesins in different seropathotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 2004; 42 (11): 4937-46.
36. Cáceres ME, Etcheverría AI, Fernández D, Rodríguez EM, Padola NL. Variation in the distribution of putative virulence and colonization factors in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from different categories of cattle. *Front Cell Infect Microbiol* 2017; 7: 147.
37. Johnson JR, Russo TA, Tarr PI, Carlino U, Bilge SS, Vary JC Jr, *et al.* Molecular epidemiological and phylogenetic associations of two novel putative virulence genes, *iha* and *iron*_{*E. coli*}, among *Escherichia coli* isolates from patients with urosepsis. *Infect Immun* 2000; 68 (5): 3040-7.
38. Johnson JR, Jelacic S, Schoening LM, Clabots C, Shaikh N, Mobley HL, *et al.* The IrgA homologue adhesin Iha is an *Escherichia coli* virulence factor in murine urinary tract infection. *Infect Immun* 2005; 73 (2): 965-71.
39. Kobayashi N, Lee K, Yamazaki A, Saito S, Furukawa I, Kono T, *et al.* Virulence gene profiles and population genetic analysis for exploration of pathogenic serogroups of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 2013; 51 (12): 4022-8.
40. Cergole-Novella MC, Nishimura LS, Fernando dos Santos L, Irino K, Vaz TM, Bergamini AM, *et al.* Distribution of virulence profiles related to new toxins and putative adhesins in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from diverse sources in Brazil. *FEMS Microbiol Lett* 2007; 274 (2): 329-34.
41. Wells TJ, Sherlock O, Rivas L, Mahajan A, Beatson SA, Torpdahl M, *et al.* EhaA is a novel autotransporter protein of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 that contributes to adhesion and biofilm formation. *Environ Microbiol* 2008; 10 (3): 589-604.
42. Torres AG, Giron JA, Perna NT, Burland V, Blattner FR, Avelino-Flores F, *et al.* Identification and characterization of *lpfABCC_DE*, a fimbrial operon of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun* 2002; 70 (10): 5416-27.

43. Torres AG, Kanack KJ, Tutt CB, Popov V, Kaper JB. Characterization of the second long polar (LP) fimbriae of *Escherichia coli* O157:H7 and distribution of LP fimbriae in other pathogenic *E. coli* strains. *FEMS Microbiol Lett* 2004; 238 (2): 333-44.
44. Danese PN, Pratt LA, Dove SL, Kolter R. The outer membrane protein, antigen 43, mediates cell-to-cell interactions within *Escherichia coli* biofilms. *Mol Microbiol* 2000; 37 (2): 424-32.
45. Torres AG, Jeter C, Langley W, Matthyse AG. Differential binding of *Escherichia coli* O157:H7 to alfalfa, human epithelial cells, and plastic is mediated by a variety of surface structures. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71 (12): 8008-15.
46. Biscola FT, Abe CM, Guth BEC. Determination of adhesin gene sequences and biofilm formation in O157 and non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from different sources. *Appl Environ Microbiol* 2011; 77 (7): 2201-8.
47. Cáceres ME. Formación de *biofilms* por cepas de *Escherichia coli* verocitotoxigénica (VTEC) y *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) sobre distintas superficies, sometidas a distintas condiciones de estrés. [Tesis Doctoral. Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires]; 2019.
48. Picozzi C, Antoniani D, Vigentini I, Foschino R. Genotypic characterization and biofilm formation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* 2017; 364 (2): fnw291.

Recibido: 4 de agosto de 2021

Aceptado: 8 de marzo de 2022