

La epidemia por *E.coli* en la primavera de 2011 y la “crisis de los pepinos”

Ante la preocupación sanitaria que la reciente epidemia por *E.coli* en Alemania ha producido en toda Europa y la importante repercusión económica que esta ha tenido para la agricultura de nuestro país, algunas instituciones académicas han sentido la necesidad de profundizar en los datos disponibles y hacer una valoración científica de los hechos. Respondiendo a esta inquietud, la Facultad de Medicina de la Universidad de Cantabria organizó el día 22 de Junio una Mesa Redonda con un enfoque multidisciplinar en la que cuatro Profesores de la misma expusieron ante un nutrido auditorio compuesto por profesores, investigadores, médicos del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla y alumnos, un resumen de la información obtenida que por su interés resumimos.

Los aspectos epidemiológicos de la epidemia fueron analizados por el Catedrático de Epidemiología y Decano de la Facultad de Medicina Dr. D. Francisco Javier Llorca quien expuso que el día 19 de mayo, el Instituto Robert Koch fue informado de la existencia de una agrupación de casos de Síndrome Urémico-Hemolítico en la zona de Hamburgo (Alemania). Los casos se atribuyeron a una cepa de *Escherichia coli* O104:H4 productora de toxina de Shiga y que se había iniciado con un primer caso declarado el 2 de mayo.

El brote presentaba características epidemiológicas distintivas: más del 80% de los casos se presentaron en pacientes mayores de 20 años, con un claro predominio en mujeres (70%); como comparación, más del 90% de los casos de Síndrome Urémico-Hemolítico ocurridos entre 2006 y 2010 se presentaron en menores de 20 años y no tuvieron predominio en ningún sexo. Un mes después, el 20 de junio, se habían declarado ya cerca de 3.600 casos de enfermedad por *E. coli* O104:H4, de los cuales, el 25% eran de Síndrome Urémico-Hemolítico. Los casos procedían desde todos los estados de Alemania pero con un claro predominio de los estados del Norte (Hamburgo, Schleswig-Holstein, Bremen, Mecklenburg-Vorpommern y Baja Sajonia). Además de Alemania, otros doce Estados Europeos (Austria, Dinamarca, España, Francia, Grecia, Holanda, Luxemburgo, Noruega, Polonia, República Checa, Reino Unido y Suecia), habían declarado en esa fecha casos similares, siendo Suecia el país con mayor número de casos (48). En España se habían declarado dos casos (uno de ellos con Síndrome Urémico-Hemolítico).

En los primeros momentos del brote, se llevó a cabo un estudio de casos y controles en Hamburgo. Así, 25 casos de síndrome urémico-hemolítico fueron

comparados con 96 controles emparejados por edad, sexo y residencia. En aproximadamente el 90% de los casos y en el 60% de los controles, se encontró el antecedente de consumo de tomates, pepinos y vegetales de hoja en ensalada, alcanzando "odds ratios" entre 4 y 7 (estadísticamente significativas). En una muestra de pepino de origen español se aisló *E. coli*, que resultó ser de una cepa diferente (no O104:H4). Estudios posteriores (de los que no se han publicado datos) han señalado a brotes de soja procedentes de una granja ecológica como la posible fuente del *E. coli*.

Hay dos aspectos epidemiológicos importantes a discutir:

1.- los posibles motivos del error al atribuir a los pepinos la fuente de infección.

2.- El retraso en la identificación del brote.

En primer lugar, hay que decir que el estudio de casos y controles realizados, tenían un tamaño de muestra pequeño; con tan escaso número de casos, el error al azar es amplio y podría justificar el resultado. En segundo lugar, todos los estudios epidemiológicos no experimentales (por ejemplo, casos y controles y estudios de cohortes) están expuestos al sesgo de confusión. Éste es un error que ocurre cuando dos factores aparecen asociados; si uno de ellos es responsable de la enfermedad, puede hacer que el otro factor parezca también asociado a la enfermedad, lo que puede haber ocurrido en este caso; los pepinos y los tomates se utilizan en ensaladas, probablemente mezclados con brotes de soja. Si los brotes han transmitido el *E. coli*, los pepinos incluidos en la misma ensalada "parecen" ser transmisores.

Otro aspecto a señalar es el retraso en la identificación del brote; desde el primer caso hasta entonces transcurrieron 17 días. El sistema alemán de declaración de enfermedades requiere una serie de pasos (local, estatal, federal, Instituto Robert Koch), que demoran la identificación de epidemias. Una editorial de la revista *Nature* ha llamado la atención sobre este punto y ha reclamado un sistema más centralizado ante microorganismos que "no respetan las fronteras".

Además y en tercer lugar, se ha sobrevalorado la importancia de los resultados microbiológicos en la investigación de una epidemia; un resultado positivo puede producirse por contaminación cruzada, pero tampoco un resultado negativo -obtenido cuando ya han transcurrido varias semanas desde el inicio de la epidemia- garantiza que ese alimento no sea responsable de la transmisión.

Los aspectos microbiológicos fueron analizados por el Dr. Luis Martínez, Profesor Titular de Microbiología y Jefe de Servicio de Microbiología del Hospital Marques de Valdecilla. El Dr. Martínez señaló que la *Escherichia coli* forma parte de la microbiota normal del intestinal del ser humano, donde representa la bacteria

facultativa anaerobia más numerosa. También ocasiona una proporción importante de las gastroenteritis agudas, y es la primera causa de infecciones extraintestinales causadas por bacterias gramnegativas. La infección entérica puede estar producida por distintas variedades patogénicas: *E. coli* enterotoxigénico, *E. coli* enteropatogénico, *E. coli* enterohemorrágico (ECEH), *E. coli* enteroagregativo, *E. coli* enteroinvasor y *E. coli* con adherencia difusa.

El brote de la primavera de 2011 que nos ocupa, está causado por una variedad de ECEH, así denominado por causar un cuadro de colitis con heces sanguinolentas. Estas cepas también se denominan verotoxigénicas, por producir citotoxinas denominadas verotoxinas (destruyen *in vitro* células Vero) o toxinas Shiga-like (se parecen a la toxina de *Shigella dysenteriae* tipo I). Se conocen dos tipos de verotoxinas: VT1/Stx1 y VT2/Stx2. Las primeras son un grupo bastante homogéneo, mientras que de las segundas existen al menos 13 variantes, siendo Stx2c, Stx2d y Stx2e las más frecuentes en cepas clínicas y de ellas, la que más comúnmente se ha relacionado con el síndrome hemolítico urémico es Stx2c. Los ECEH que producen Stx2 (sola –como en el brote actual- o asociada a Stx1) causan SHU con más frecuencia que las que producen solo Stx1. Estas toxinas están codificadas por genes *stx*, propios de bacteriófagos. Varios estudios han sugerido que el uso de antimicrobianos frente a estos microorganismos puede ser contraproducente, porque la lisis bacteriana aumenta la cantidad de toxina liberada o debido a que algunos antimicrobianos pueden inducir la expresión génica en los bacteriófagos correspondientes.

Muchas cepas de ECEH se unen a la membrana de las células del epitelio intestinal mediante la intimina (codificada por el gen *eae*), ocasionando luego una lesión característica con destrucción local de las microvellosidades. La cepa del brote actual carece de este gen. Las verotoxinas afectan la circulación intestinal local, ocasionando una disminución de la actividad antitrombótica y fibrinolítica y si se producen en suficiente cantidad, sobreviene una isquemia mesentérica. La toxina, puede llegar a la circulación sistémica, y unida a polimorfonucleares puede alcanzar otros órganos, incluyendo riñones y el sistema nervioso central. La toxina también puede estimular la producción de citoquinas proinflamatorias en los monocitos.

La tipificación de las distintas variantes de ECEH (y de las otras variantes patogénicas) se ha venido realizando mediante el reconocimiento de los antígenos O (fracción polisacárido del lipopolisacárido de la pared) y H (asociado a los flagelos), con anticuerpos específicos. La mayor parte de los ECEH corresponden al serotipo O157:H7. Otros serotipos (p. ej. O26:H11/H-, O111:H-) son menos frecuentes. El brote europeo de esta primavera está causado por el serotipo

O104:H4, identificado en 2006 en una paciente coreana. En la actualidad se está empleando la tipificación mediante electroforesis en campo pulsado y MLST.

La temperatura óptima de crecimiento de los ECEH es de 37 °C, pero pueden crecer en un amplio rango de temperaturas y soportar un pH de tan solo 4,4. Los criterios microbiológicos para la confirmación de un caso por ECEH O104:H4, incluyen uno de estos cuatro: (i) cultivo del patógeno en heces y detección en el mismo de Stx2 por ELISA, (ii) detección por PCR del gen *stx2* en la misma muestra donde se ha identificado el patógeno (incluso en cultivo mixto), (iii) detección de IgM anti-LPS específica de serogrupo (ELISA(WB) y (iv) incremento significativo en el título de IgG anti-LPS específica de serogrupo (ELISA) en dos muestras separadas.

Hay pocos datos sobre la sensibilidad a los antimicrobianos de los ECHE. La cepa actual O104:H4 produce la beta-lactamasa de espectro extendido CTX-M-15 y TEM-1 y además, es resistente a estreptomycin, tetraciclina y cotrimoxazol.

El Dr. D. Juan Maria Garcia-Lobo, Catedrático de Microbiología, expuso cómo el abordaje genómico en esta epidemia ha dado resultados espectaculares y marca un nuevo rumbo para el procedimiento a seguir ante un brote infeccioso en el futuro.

Así, la primera información pública de un ensamblaje preliminar del genoma de la bacteria causante del brote se tuvo el 2 de junio. Los primeros datos fueron obtenidos con una nueva tecnología (Ion Torrent, Life Technologies) que es rápida y económica, aunque las secuencias tienden a ser cortas y de calidad media. Estos datos se completaron en las semanas siguientes con los obtenidos con tecnología mas costosa (Illumina, Roche-454). En la actualidad (21 de junio), disponemos de secuencias de 9 aislamientos independientes. Los datos de mejor calidad que han permitido ensamblajes completos más rápidamente han sido los de 454-Roche.

Los resultados disponibles indican que la bacteria responsable del brote posee un genoma consistente en un cromosoma circular de 5.278.900 pb y tres plásmidos. La comparación de los cromosomas muestra que todas las cepas secuenciadas son esencialmente idénticas y muestran un 96% de sus secuencias casi idénticas a las de un aislamiento ya secuenciado de un *E. coli* enteroagregativo (EAEC), Ec 55989, causante de diarreas y aislado en la República Centrafricana.

Las diferencias más significativas entre el *E. coli* causante del brote y Ec55989 se localizan en 4 regiones (islas) que aportan 250 kb. La más notable es un profago portador de los genes de la toxina Shiga tipo 2. Se ha identificado otro profago aparentemente sin carga y dos secuencias con propiedades de islas génicas. Una de ellas contiene numerosos genes de resistencia y posibles

adhesinas. La otra contiene genes de resistencia a telurito, producción de una microcina y genes relacionados con adhesinas-producción de biofilm. Ambas pudieran ser elementos replicativos-integrativos.

Uno de los plásmidos está relacionado con los que habitualmente se encuentran en cepas EAEC pero con alguna diferencia. El segundo es un plásmido común en enterobacterias, del grupo Incla y conteniendo genes de resistencia TEM-1 y CTX-M15.

Hay un tercer plásmido críptico de solo 1,5 kb.

Los datos genómicos explican perfectamente las propiedades de estos aislamientos de un *E. coli* muy virulento con propiedades combinadas de los patotipos EAEC y enterohemorrágico. Se puede entender en ellos, un aumento de la capacidad de adhesión. La virulencia aumentada necesitará probablemente estudios de expresión para comprobar una producción aumentada de toxina o de caracterización, que prueben una mayor toxicidad de las toxinas de estas cepas.

Por otra parte el análisis genómico suministra información para desarrollar herramientas de diagnóstico específicas para este brote.

Dos aspectos a destacar en el abordaje genómico de esta epidemia han sido : 1) la liberación pública de los datos y establecimiento de un repositorio abierto al que la comunidad científica ha aportado los resultados de los análisis que cada uno ha hecho de los datos disponibles. <https://github.com/ehec-outbreak-crowdsourced/BGI-data-analysis/wiki> y 2) ha proporcionado experiencia para el diseño de protocolos de actuación frente a epidemias futuras.

Para finalizar la Profesora Titular de Enfermedades Infecciosas Dra. Carmen Fariñas Alvarez expuso que el cuadro clínico del síndrome hemolítico urémico (SUH) que sigue al episodio de diarrea hemorrágica, se caracteriza por la triada clásica: Anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia e insuficiencia renal aguda.

La Anemia hemolítica microangiopática es producida por el traumatismo mecánico que sufren los hematíes al circular por el lecho vascular alterado o por el estrés oxidativo sobre los hematíes. En la extensión de sangre periférica se observan hematíes fragmentados (esquistocitos). La Trombocitopenia es debida al consumo periférico. Debido a la intensa trombocitopenia los pacientes pueden presentar: púrpura cutánea, hemorragias retinianas, gingivales, digestivas, metrorragias, epistaxis o hematuria.

En relación con la Insuficiencia renal aguda se producen con frecuencia en el SHU un cuadro clínico de hipertensión arterial, alteraciones hepáticas y alteraciones neurológicas.

El tratamiento de los enfermos, es fundamentalmente de mantenimiento, que consiste en hidratación y diálisis o plasmaféresis (6-15 sesiones/día). Se están probando tratamientos nuevos para los casos más graves en los hospitales de Alemania, pero no se ha hecho pública información específica sobre los resultados obtenidos. Sin tratamiento la mortalidad se acerca al 90%.

Según las recomendaciones del panel de expertos que ha reunido a la Sociedad Alemana de Enfermedades Infecciosas y a profesionales de otras Sociedades Científicas de Alemania:

-No deben de usarse antibióticos como las fluorquinolonas y el cotrimoxazol ni tampoco aminoglucósidos ni fosfomicina. Además, ciertos antibióticos, en particular las quinolonas, trimetropin y flurazolidone, son potentes inductores de la expresión del gen de la Shiga-toxina 2 y pueden incrementar el nivel de toxina en el intestino.

-Si es necesario un tratamiento como en el caso de pacientes que presenten enfermedad invasiva debida a STEC o a una sobreinfección, debe de usarse carbapenem como mejor elección.

-Si fuera necesario por otras razones, los nuevos macrólidos y la rifampicina también se consideran seguros, aunque sigue habiendo una gran controversia.

-En pacientes con persistencia de la colonización por ECEH, enfermedad grave y progresión clínica, pero sin indicación de tratamiento antibiótico sistémico, la rifaximina de uso sistémico puede ser una opción útil y segura para la erradicación de ECEH en el tracto intestinal.

Finalmente, destacar que a las exposiciones reseñadas anteriormente siguió un animado debate que se centró en las dificultades para establecer con certeza el origen de la epidemia. Se recalcó el más que posible el origen humano del *E. coli* causante y la sorprendente contaminación fecal de los vegetales que se apuntan como causantes de la epidemia. También se comentó la escasez de datos y la poca eficacia de los sistemas de notificación epidemiológica. Se apuntó la posibilidad de que la trasmisión persona-persona o a través de fomites pueda tener más importancia de la esperable en una epidemia típica de origen alimentario. También se reconoció la dificultad del tema y se recuerda que en la mayor parte de las epidemias infecciosas no se llega a identificar su origen.
