

CONTROL DE *ESCHERICHIA COLI* ENTEROHEMORRAGICO (EHEC) EN EL GANADO BOVINO

ELSA C. MERCADO

*Instituto de Patobiología, Centro de Investigación en Ciencias Veterinarias y Agronómicas, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). CC 25, 1712 Castelar, Prov. Buenos Aires. Argentina*

**Resumen** El ganado bovino es considerado el principal reservorio y origen de la infección por *Escherichia coli* productor de toxina Shiga (STEC) para el hombre. Hasta el presente las estrategias de intervención para evitar la contaminación de los productos cárnicos se han centralizado en la planta de faena con la aplicación de prácticas que evitan la contaminación y proliferación de STEC. Actualmente se considera que el control de STEC en el ganado bovino debe empezar dentro del establecimiento productor. Este podría ser uno de los puntos de intervención más importantes para disminuir la incidencia de infección en el hombre. Vacunas, probióticos, bacteriófagos, y modificaciones en los procedimientos de producción serían estrategias útiles para el control de EHEC en el ganado. Sin embargo, la aplicación de estas medidas de intervención podría verse dificultada por tratarse de una zoonosis que no afecta mayormente la sanidad de los animales de consumo. En Argentina el SUH es una enfermedad endémica, desconociéndose aún las causas de esta situación epidemiológica. La aplicación de estrategias de control de EHEC contribuirá, sin duda, a disminuir la incidencia de esta zoonosis.

**Palabras clave:** control, EHEC, bovinos

**Abstract** *Control of enterohemorrhagic Escherichia coli (EHEC) in cattle.* Cattle are recognized as the major reservoir of STEC and the source of infection for human beings. Until recently, intervention strategies to decrease the contamination of meat products have been focused on the slaughter plant with the application of practices to reduce the contamination and proliferation of STEC. This has now changed following the development of intervention strategies in the farm. This could be one of the most important points of intervention to lower the incidence of human infection. Vaccines, probiotics, bacteriophages, and changes in production practices may be useful as strategies to control EHEC in the cattle. The application of such intervention measures could be difficult due to the fact that this zoonotic agent rarely causes disease in bovines. The HUS is endemic in Argentina, and the factors leading to this epidemiological situation remain unknown. However, intervention strategies undoubtedly will contribute to reduce the incidence of this zoonosis.

**Key words:** control, EHEC, cattle

*Escherichia coli* (*E. coli*) es una bacteria capaz de adaptarse al tracto gastrointestinal de diferentes hospedadores. Numerosos factores de virulencia, codificados por elementos genéticos adquiridos a través de su evolución, han sido identificados en cepas de *E. coli* aisladas de animales y han conducido a la aparición de distintas categorías de *E. coli* patógenas. Una de dichas categorías se caracteriza por la producción de citotoxinas, denominadas toxinas Shiga (Stx) o Verocitotoxinas (VT), que inhiben la síntesis proteica en la célula eucariota. *E. coli* productores de toxina Shiga (STEC) han sido aislados del contenido intestinal de mamíferos y aves, pero su capacidad de producir enfermedad ha

sido demostrada sólo en el hombre, cerdos y terneros. Las cepas patógenas humanas y las aisladas de bovinos u otros rumiantes sanos o con diarrea<sup>1-3</sup> poseen marcadores de virulencia comunes, en tanto que las cepas patógenas para el cerdo tienen características propias de virulencia. Recientemente, Pistone Creydt *et al.*<sup>4</sup> demostraron que cepas STEC aisladas de terneros con diarrea sanguinolenta tienen efecto citopático sobre colon humano *in vitro*. Por este motivo es que los rumiantes, en particular bovinos, son señalados como el principal reservorio y origen de la infección por STEC para el hombre. La enfermedad por STEC es considerada por la Organización Mundial de Sanidad Animal (originalmente Oficina Internacional de Epizootias -OIE-) como una zoonosis bacteriana de origen alimentario<sup>5</sup>.

Dentro del espectro de cepas STEC que son capaces de colonizar el tracto intestinal del bovino sólo un número limitado de serotipos son patógenos para la especie, produciendo diarrea en terneros. La gran mayoría de los

serotipos de STEC de origen bovino han sido recuperados de animales sanos, entre ellos el serotipo O157:H7, mundialmente asociado a brotes de enfermedad intestinal en el hombre y principal responsable de complicaciones sistémicas graves, como el Síndrome Urémico Hemolítico (SUH). Esta situación particular, donde el agente zoonótico no afecta en muchos casos la eficiencia de producción, debe ser considerada cuando se plantean estrategias de control pre-faena que reduzcan la colonización del bovino por STEC. Este podría ser uno de los puntos de intervención más importantes para disminuir la incidencia de infección por STEC en el hombre.

Existen distintas propuestas para disminuir la contaminación fecal del bovino en la etapa pre-faena, que incluyen la inmunización, el empleo de probióticos o bacteriófagos y la modificación de las prácticas de manejo dentro del establecimiento para reducir la transmisión y persistencia de las cepas de STEC dentro del rodeo.

## Inmunización

Las cepas STEC que con mayor frecuencia han sido asociadas a enfermedad grave en el hombre, como colitis hemorrágica y SUH, son conocidas como *E. coli* enterohemorrágico (EHEC). La mayoría de los EHEC posee características distintivas tales como el serotipo, la capacidad para producir la lesión A/E (attaching and effacing) en cultivos de células epiteliales y en intestino de animales<sup>6</sup> y la presencia de plásmidos de virulencia. Algunos serotipos de EHEC se adhieren extensivamente y forman la lesión A/E a nivel del íleon y colon del bovino, mientras que EHEC O157:H7 se adhiere preferencialmente a la mucosa asociada a folículos linfoides del recto terminal. La lesión A/E se caracteriza por la unión íntima de la bacteria a la célula epitelial, con destrucción de las microvellosidades y formación de estructuras tipo pedestal, donde filamentos de actina y otros elementos del citoesqueleto se acumulan en forma adyacente a la bacteria. Las proteínas responsables de la lesión A/E son codificadas por una isla de patogenicidad llamada locus de borrado de los enterocitos (locus of enterocyte effacement- LEE-)<sup>6</sup>. Dentro del LEE se han identificado distintas regiones funcionales, que codifican para proteínas translocadoras componentes de un sistema de secreción tipo III (TTSS) y proteínas que son translocadas dentro de la célula<sup>7</sup>. Intimina o Eae, es una proteína de transmembrana que produce la unión íntima de la bacteria a la mucosa intestinal y la desaparición de las microvellosidades. Esta proteína posee una región N-terminal constante y una región C-terminal variable que ha permitido la clasificación en distintos subtipos, los cuales generalmente se encuentran asociados al serotipo<sup>8</sup>.

Como ha sido demostrado por infecciones experimentales, se requiere intimina para la colonización y patogénesis de EHEC en terneros y cerdos<sup>9</sup>. Los anticuerpos anti-intimina<sub>O157</sub> reducen significativamente la adherencia de *E. coli* O157:H7 a células epiteliales HEp-2, como así también la de otras cepas EHEC que poseen intiminas relacionadas<sup>10</sup>. Por otra parte, se ha observado que las proteínas EspA, EspB, y Tir del TTSS, e intimina son reconocidas por los anticuerpos presentes en pacientes con infecciones por EHEC<sup>011</sup>. Coincidentemente, nuestro grupo de trabajo observó la presencia de IgG anti-EspB y anti-intimina gamma en calostro de vacas no inmunizadas<sup>12</sup>.

La respuesta inmune a estos componentes del LEE indica que estas proteínas son potenciales candidatas a vacuna para prevenir la infección por EHEC. Las experiencias de Dean-Nystrom et al.<sup>13</sup> demostraron que se produce transferencia de IgG del calostro de cerdas inmunizadas con intimina gamma recombinante, protegiendo a los lechones de la infección por EHEC<sub>O157</sub>. Por otra parte, Potter et al.<sup>14</sup> observaron que la vacunación del ganado bovino con proteínas del TTSS de EHEC<sub>O157</sub> disminuye la excreción fecal de *E. coli* O157:H7. Evidencias recientes demostraron que la inmunización activa de ratones con intimina alfa recombinante previene la colonización por *Citrobacter rodentium*, un patógeno murino intimina-positivo<sup>15</sup>.

Teniendo en cuenta que se ha observado reacción inmunológica cruzada entre distintos subtipos de intimina o de otras proteínas del TTSS, se podría esperar que la inmunización con una o varias de estas proteínas protegiera contra el espectro de EHEC más frecuente y mayormente asociados a enfermedad grave en el hombre.

Las secuencias genéticas *efa1*, *toxB*, *iha*, *saa*, *ompA*, *sfp* y *lpf* situadas fuera del LEE, codifican posibles adhesinas que podrían intervenir también en la colonización intestinal del bovino por STEC<sup>9</sup>. Sin embargo, poco se conoce acerca de la identidad de sus productos de expresión.

Dado que no está definido el rol de estas proteínas en la patogénesis, la adhesina intimina, a pesar de presentar polimorfismo y estar restringida a ciertos serotipos de STEC, es una de las candidatas más firme a vacuna en los bovinos hasta el momento. Tal como ha sido demostrado en cerdos, la inmunización pasiva de los neonatos a través del calostro de madres vacunadas con intimina podría evitar la colonización temprana de los terneros por cepas STEC LEE-positivas. La mayoría de los estudios de prevalencia en bovinos señala a los animales más jóvenes, sanos o diarreicos, como principales excretores de las cepas STEC LEE-positivas<sup>1,2</sup>. Por otra parte, la utilización de la vacuna en animales próximos a ingresar a frigorífico o al feed-lot reduciría la posibilidad de contaminación de la carne.

Al igual que intimina, otras proteínas del LEE, tales como EspA, EspB y Tir, desencadenan una respuesta inmune específica en pacientes con SUH y en animales infectados, y son consideradas potenciales inmunógenos para reducir la infección por EHEC, si bien debe tenerse en cuenta que varias de estas proteínas presentan polimorfismo asociado al serotipo. Nuestro grupo de trabajo ha obtenido resultados alentadores al evaluar formulaciones vacunales intranasales basadas en intimina y EspB recombinantes purificadas, en ratones BALB/c. Se observó que estas proteínas, administradas con adyuvantes adecuados, inducen una fuerte respuesta humoral y celular, con proliferación de células T específicas y aumento de IgA secretora<sup>16</sup>.

## Probióticos

Los probióticos son suplementos consistentes en bacterias viables naturales que modifican el balance de la microflora intestinal con efectos beneficiosos para el animal y eliminan microorganismos que son peligrosos para el hombre. Se ha observado que algunas cepas de *Clostridium butyricum* y bacterias lácticas como *Lactobacillus casei* y *L. rhamnosus* tienen efecto protector evitando la infección por *E. coli* O157:H7 en ratón y conejo lactante<sup>17, 18</sup>, y en células intestinales humanas *in vitro*<sup>19</sup>. Por otra parte, la administración de cultivos probióticos seleccionados de *Lactobacillus acidophilus* logró reducir la excreción de *E. coli* O157:H7 en bovinos<sup>20, 21</sup>. Estos efectos podrían atribuirse a la producción de ácidos u otros metabolitos inhibidores de *E. coli* O157:H7, a la competencia por sitios de unión a la mucosa intestinal, o bien a una inducción de respuesta inmune de la mucosa. Recientemente, Echeverría et al.<sup>22</sup> aislaron cepas de *E. coli* de colon bovino con actividad inhibitoria *in vitro* sobre *E. coli* O157:H7.

Sin embargo, el largo ciclo de producción del bovino reduce la posibilidad de mantener un alto nivel de estos microorganismos en el tracto intestinal, limitando la aplicación de probióticos a los animales listos para la faena.

## Bacteriófagos

Se ha propuesto que bacteriófagos líticos específicos, aislados del rumen y contenido intestinal de bovinos y ovinos, pueden ser utilizados para disminuir la presencia de *E. coli* O157:H7 en una población mixta de bacterias<sup>23</sup>. Pero si bien la actividad *in vitro* de los bacteriófagos es elevada, se reduce en los ensayos *in vivo*. Además, el posible desarrollo de resistencia, hace que no se justifique actualmente el uso de este método para el control de *E. coli* O157:H7, aunque podría ser útil para disminuir la contaminación inmediatamente antes de la faena.

## Dieta

Los sistemas de crianza en *feedlot* y tambos de alto rendimiento utilizan grandes raciones de granos para aumentar la eficiencia de producción. En estas condiciones, el almidón no degradado pasa del rumen al intestino donde sufre una segunda fermentación microbiana. STEC es capaz de fermentar los azúcares liberados del almidón en el colon. En las experiencias donde la dieta fue cambiada abruptamente de maíz a forraje se observó una disminución en la población de *E. coli* genérico de hasta 1000 veces en pocos días, o bien menos animales excretaban *E. coli* O157:H7<sup>24</sup>. Este cambio en la dieta pocos días antes del ingreso al frigorífico no afecta los parámetros de calidad de la carcasa, aunque su implementación tiene costos que deben ser considerados.

## Prácticas de manejo

*E. coli* O157:H7 se transmite naturalmente entre los bovinos dentro de un establecimiento. Algunos de los factores que condicionan esa diseminación son la alimentación, el manejo del estiércol y aguas residuales, y la presencia de otros animales domésticos e insectos. El agua contaminada por heces bovinas podría ser un reservorio para la transmisión horizontal entre los animales del establecimiento, a la vez que su utilización como agua de riego aumenta el riesgo de infección para humanos.

El ayuno de los animales previo al ingreso al frigorífico, aumenta la excreción de *E. coli*, probablemente a causa de la disminución de ácidos grasos volátiles en el rumen e intestino. Se ha observado que los terneros sometidos a ayuno, o durante el destete, son más susceptibles a la colonización por *E. coli* O157:H7.

El control de estos factores de riesgo debería reducir las posibilidades de multiplicación y diseminación de STEC dentro y fuera del establecimiento.

## Conclusiones

Aunque existe consenso mundial sobre el rol del bovino como principal reservorio de STEC, no se ha podido correlacionar con certeza una mayor incidencia de infección en el humano con la alta prevalencia de STEC en el ganado. Esto se debe fundamentalmente a que ha aumentado la sensibilidad de los métodos de detección de STEC en el ganado. Las medidas de control se han centralizado en las condiciones de faena y el desarrollo de prácticas que eviten la contaminación y proliferación de STEC en los productos cárnicos. Dado que estas prácticas resultan insuficientes, actualmente se considera que el control de STEC en el ganado bovino debe empezar

en la etapa previa al ingreso al frigorífico. La aplicación de vacunas e inhibidores y la modificación de procedimientos de producción son estrategias de difícil aplicación al tratarse de una zoonosis que no afecta mayormente la sanidad de los animales de consumo. En Argentina el SUH es una enfermedad endémica<sup>25</sup>, desconociéndose aún las causas de esta situación epidemiológica. Sin embargo, el control de EHEC en el animal en pie, la adopción de métodos de análisis de riesgo y puntos críticos de control en el frigorífico, y el cumplimiento de normas de higiene y prevención por los manipuladores de alimentos son estrategias de intervención necesarias para reducir la incidencia de esta zoonosis.

## Bibliografía

- Meichtri L, Miliwebsky E, Gioffre A, et al. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in healthy young beef steers from Argentina: prevalence and virulence properties. *Int J Food Microbiol* 2004; 96: 189-98.
- Mercado EC, Gioffre A, Rodriguez SM, et al. Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from diarrhoeic calves in Argentina. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2004a; 51: 82-8.
- Mercado EC, Rodriguez SM, Elizondo AM, Marcoppido G, Parreño V. Isolation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from a South American camelid (*Lama guanicoe*) with diarrhea. *J Clin Microbiol* 2004b; 42: 4809-11.
- Pistone Creydt V, Venzano A, Vilte DA, Mercado EC, Ibarra C. Cytotoxic effect in human colon of enterohemorrhagic *Escherichia coli* isolated from calves with bloody diarrhea. *Rev Argent Microbiol* 2005; 37: 117-21.
- Sitio web de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE): <http://www.oie.int>
- Kaper JB. Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Curr Opin Microbiol* 1998; 1: 103-8.
- Garmendia J, Frankel G, Crepin VF. Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections: translocation, translocation, translocation. *Infect Immun* 2005; 73: 2573-85.
- Torres AG, Zhou Z, Kaper JB. Adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* strains to epithelial cells. *Infect Immun* 2005; 73: 18-29.
- Dean Nystrom EA, Bosworth BT, Moon HW, O'Brien AD. *Escherichia coli* O157:H7 requires intimin for enteropathogenicity in calves. *Infect Immun* 1998; 66: 4560-3.
- Gansheroff LJ, Wachtel MR, O'Brien AD. Decreased adherence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* to HEp-2 cells in the presence of antibodies that recognize the C-terminal region of intimin. *Infect Immun* 1999; 6: 6409-17.
- Jenkins C, Chart H, Smith HR, et al. Antibody response of patients infected with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* to protein antigens encoded on the LEE locus. *J Med Microbiol* 2000; 49: 97-101.
- Vilte DA, Larzábal M, Elizondo AM, Cataldi AA, Mercado EC. Evidence of antibodies against enterohemorrhagic *Escherichia coli* virulence associated proteins in bovine colostrum. En: Proceedings from 12th International Symposium of the World Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians (WAVLD). VII OIE Seminar on Biotechnology, Montevideo, 2005.
- Dean-Nystrom EA, Gansheroff LJ, Mills M, Moon HW, O'Brien AD. Vaccination of pregnant dams with intimin O157 protects suckling piglets from *Escherichia coli* O157:H7 infection. *Infect Immun* 2002; 70: 2414-8.
- Potter AA, Klashinsky S, Li Y, et al. Decreased shedding of *Escherichia coli* O157:H7 by cattle following vaccination with type III secreted proteins. *Vaccine* 2004; 22: 362-9.
- Ghaem-Maghani M, Simmons CP, et al. Intimin-specific immune responses prevent bacterial colonization by the attaching-effacing pathogen *Citrobacter rodentium*. *Infect Immun* 2001; 69: 5597-605.
- Cataldi A, Yevsa T, Vilte DA, et al. C280 Intimin and EspB are promising antigens for the stimulation of mucosal immune responses against EHEC. En: Proceedings from 6th International Symposium on Shiga Toxin (Verocytotoxin) – producing *Escherichia coli* infections (VTEC 2006 Melbourne), Australia, 2006.
- Ogawa M, Shimizu K, Nomoto K, et al. Protective effect of *Lactobacillus casei* strain Shirota on Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 infection in infant rabbits. *Infect Immun* 2001; 69: 1101-8.
- Takahashi M, Taguchi H, Yamaguchi H, Osaki T, Komatsu A, Kamiya S. The effect of probiotic treatment with *Clostridium butyricum* on enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 infection in mice. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2004; 41: 219-226.
- Hirano J, Yoshida T, Sugiyama T, Koide N, Mori I, Yokochi T. The effect of *Lactobacillus rhamnosus* on enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection of human intestinal cells *in vitro*. *Microbiol Immunol* 2003; 47: 405-9.
- Brashears M, Galyean I, Loneragan GH, Mann, Killinger-Mann K. Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 and performance by beef feedlot cattle given *Lactobacillus* direct-fed microbials. *J Food Prot* 2003; 66: 748-54.
- Zhao T, Doyle MP, Harmon BG, Brown CA, Mueller PO, Parks AH. Reduction of carriage of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in cattle by inoculation with probiotic bacteria. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 641-7.
- Etcheverria AI, Arroyo GH, Perdigon G, Parma AE. *Escherichia coli* with anti-O157:H7 activity isolated from bovine colon. *J Appl Microbiol* 2006; 100: 384-9.
- Sheng H, Knecht HJ, Kudva IT, Hovde CJ. Application of bacteriophages to control intestinal *Escherichia coli* O157:H7 levels in ruminants. *Appl Environ Microbiol* 2006; 72: 5359-66.
- Callaway TR, Elder RO, Keen JE, Anderson RC, Nisbet DJ. Forage feeding to reduce preharvest *Escherichia coli* populations in cattle. *J Dairy Sci* 2003; 86: 852-80.
- Sitio web de la Sociedad Argentina de Pediatría: <http://www.sap.org.ar>