

SITUACIÓN Y CONTROL DE *Escherichia coli* VEROCITOTOXIGÉNICO (VTEC) EN BOVINOS USO DE PROBIÓTICOS



Dra Analía Inés Etcheverría
Laboratorio Inmunoquímica y Biotecnología.
FCV. UNCPBA. CIC
Tandil

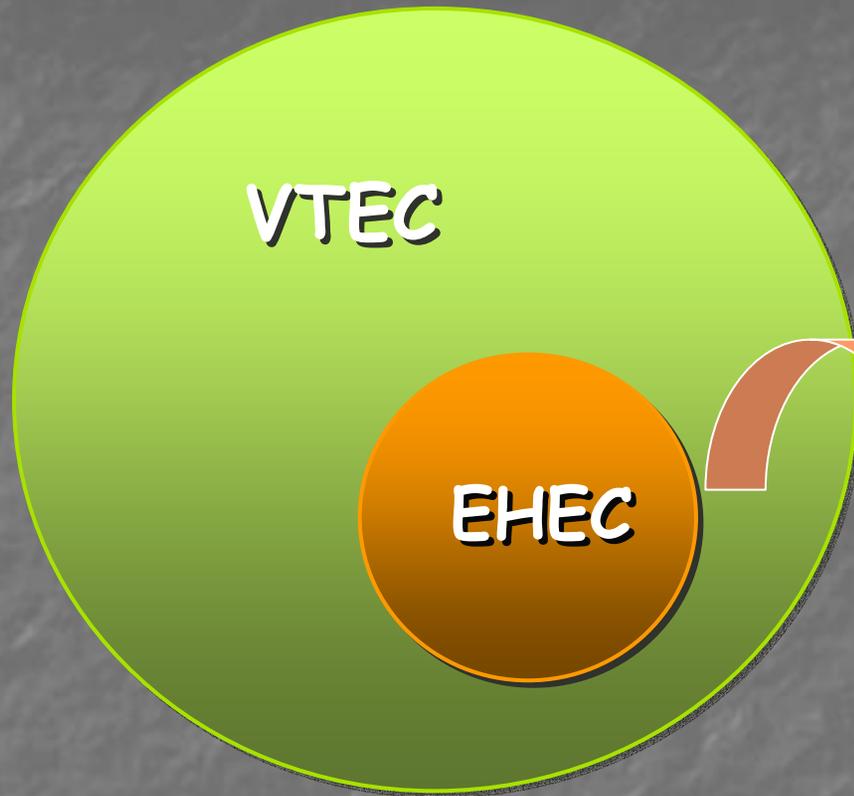
Escherichia coli



Escherichia coli verocitotoxigénico (VTEC)



Escherichia coli enterohemorrágico (EHEC)



VTEC

EHEC

Enfermedad en el hombre

Verocitotoxinas

LEE

Plásmido (EhxA)

O157:H7 / no-O157

Escherichia coli enterohemorrágico (EHEC)

Factores de virulencia

cromosoma

fagos

plásmido

Escherichia coli enterohemorrágico (EHEC)

Cromosomas

Aparato Secreción III

LEE Translocación de proteínas

Sistema adherencia

Intimina (*eae*)

Tir (*tir*)

Fago

Verocitotoxinas 1, 2 y variantes

Plásmido

EhxA, *Saa*, *Sab*, *EspP*

Lesión A/E



LEE

ENFERMEDAD EN EL HOMBRE

- * Portador asintomático
 - * Diarrea acuosa
 - * Diarrea sanguinolenta
- * SÍNDROME URÉMICO HEMOLÍTICO (SUH)

ARGENTINA

- * Insuficiencia renal aguda
- * Insuficiencia renal crónica
- * Trasplante renal en niños

Transmisión al hombre

* Consumo de alimentos y agua contaminados



* Agua recreacional contaminada



* Transmisión persona-persona



* Contacto directo con animales





SITUACIÓN EN ARGENTINA

PASTOREO

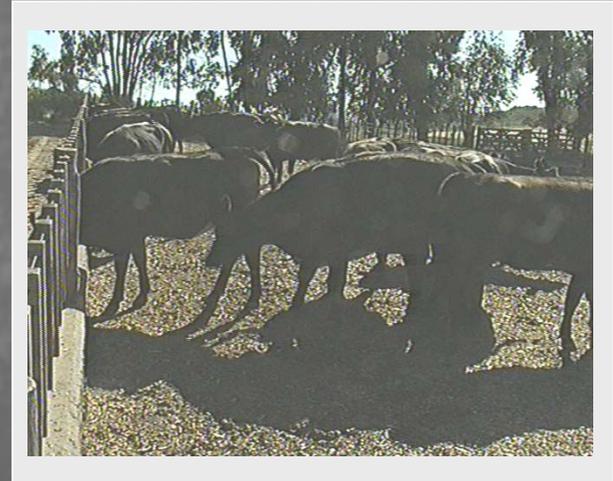
33% VTEC +



FEEDLOT

62,7 % VTEC +
Muestreo seriado

6 % VTEC +
Muestreo único



Bovinos adultos (22%)

O20:H19; O91:H21;

O113:H21

O116:H21; O117:H7;

O171:H2

O174:H21

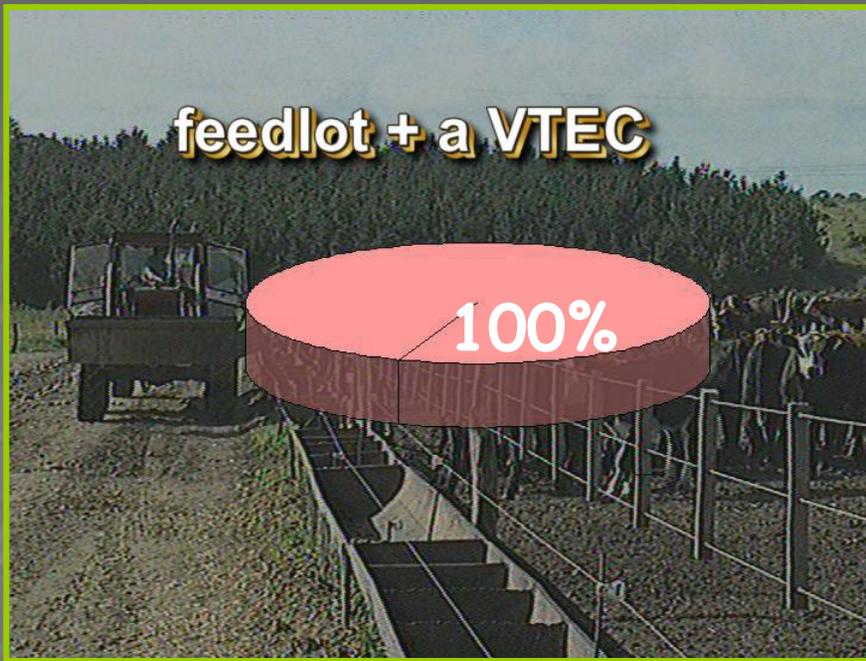


Terberos (27%)

O174:H21; O26:H2;

O103:H-;

O111:H7; O113:H2



- O20:H19
- O91:H21
- O113:H21
- O117:H7
- O145:H-
- O174:H21
- O120:H19
- O157:H7

28 % Feedlot O157

6,7 % animales O157





PORCENTAJES DE ANIMALES POSITIVOS A O157:H7



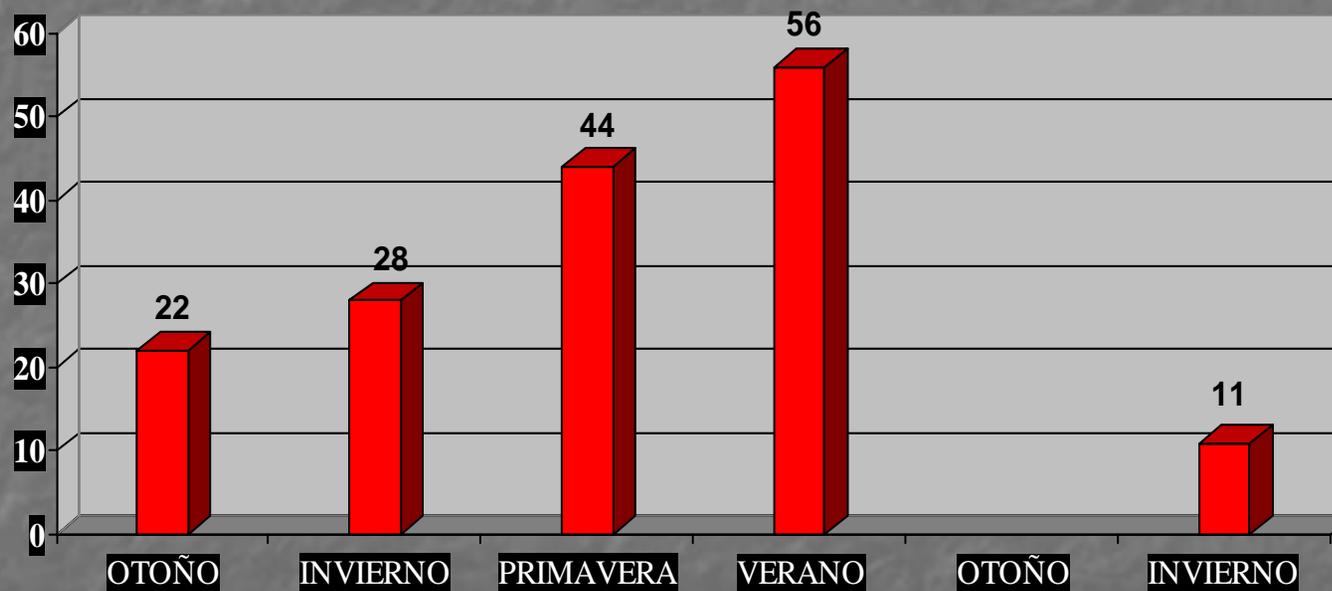
0,8%



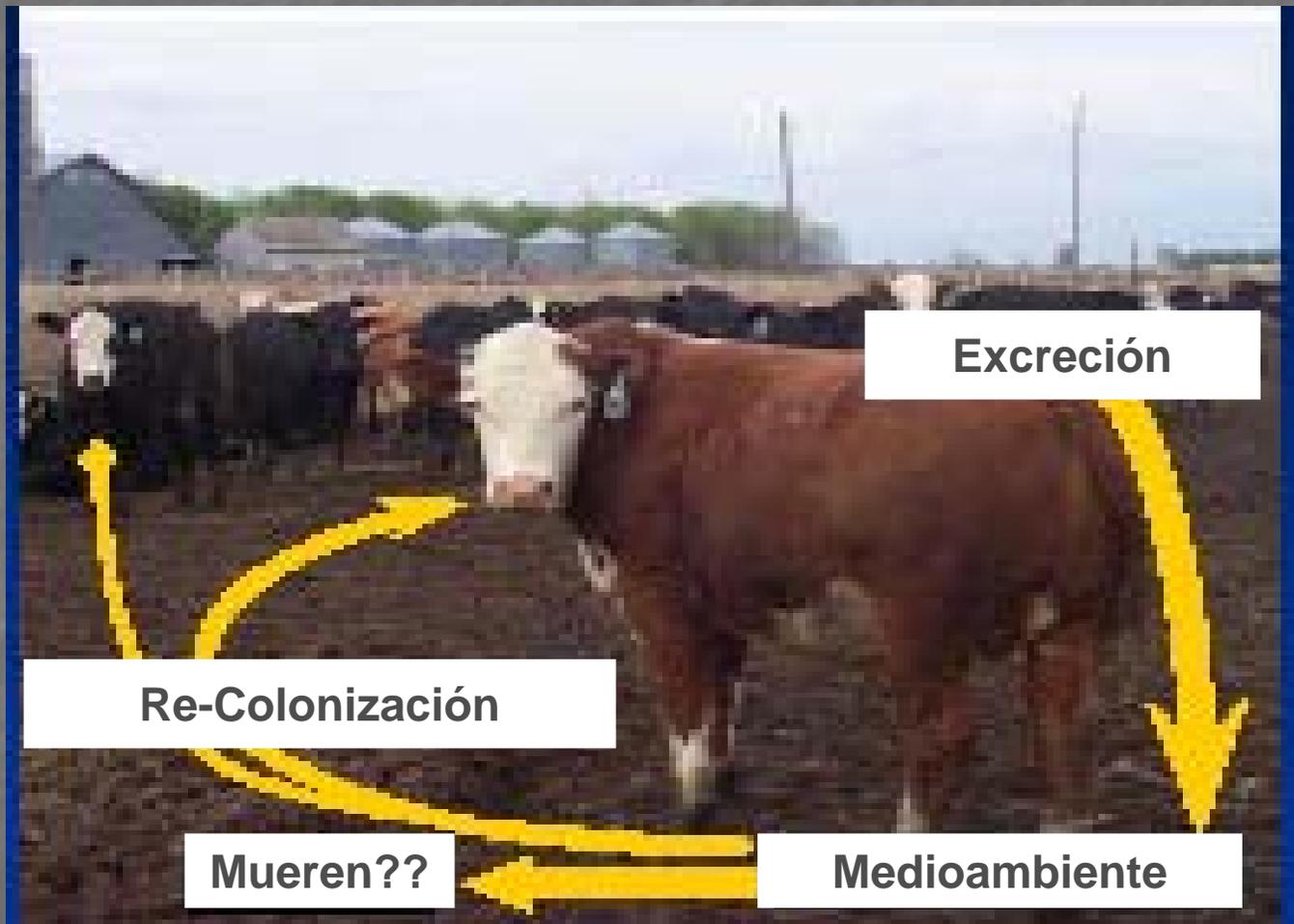
0,2%

PREVALENCIA ESTACIONAL DE VTEC

VACAS EN ORDEÑO



MEDIO AMBIENTE



MEDIO AMBIENTE



Suelo 26%



Agua y sedimento
16%



Comedero
16%

27%

VTEC-ambiente
22,62%

22%



12%

54%



30%

53%



43%

Carcasas

Frigoríficos → 12,34 %

Cabina Sanitaria → 18,64 %

Nalga → 12,12 %

Carnicerías → 25,00 %

Aguja → 12,12 %

Carne Picada → 40,74 %

Serotipos de VTEC asociados a Síndrome Urémico Hemolítico

<i>Terneros</i>	<i>Bovinos Pastoreo</i>	<i>Bovinos Feedlot</i>	<i>Frigorífico</i>	<i>Alimentos</i>
O5:H-	O20:H19	O2:H25	O2:H5	O20:H19
O20:H19	O91:H21	O20:H19	O20:H19	O22:H8
O26:H11	O113:H21	O91:H21	O113:H21	O91:H21
O111:H-		O103:H2	O174:H21	O113:H21
O103:H-		O113:H21	O103:H-	O157:H7
O103:H2		O145:H-		O174:H21
O118:H16		O157:H7		
O165:H-		O171:H		
O174:H21		O174:H21		

Serotipos compartidos entre bovinos y alimentos derivados.

VTEC y RUMIANTES

terneros recién nacidos hasta 4 meses



Enfermedad intestinal

Lesiones A/E en ID e IG

Diarrea (muerte)

VTEC y RUMIANTES

jóvenes y adultos



Estado de portador

Sanos

Colonizados/eliminadores

Eliminación intermitente

- * Primeros días de infección

Terneros 10^4 - 10^8 ufc/g MF

Adultos 10 - 10^7 ufc/g MF

- * Días posteriores

Terneros 10^4 ufc/g MF

Adultos 10^2 ufc/g MF

Sólo por enriquecimiento

- * "Supershedders"

Sitios de colonización

- * Rumen (AGV. Anaerobios comensales)
- * TGI medio-posterior (Íleon terminal, ciego y colon)
- * Unión recto-anal (RAJ)



ESTRATEGIAS DE CONTROL

- * identificación y erradicación
- * control pre faena de todos los animales
- * otras medidas pre faena
- * vacunas
- * antibióticos tradicionales
- * bacteriófagos
- * inhibición específica por inhibición metabólica
- * exclusión competitiva

Exclusión competitiva

Limita la población de bacterias patógenas

- * competencia por nutrientes
- * unión a receptores del TGI
- * producción de componentes antimicrobianos

PROBIÓTICOS

Son microorganismos vivos que, ingeridos con el alimento, afectan en forma beneficiosa al hospedador mejorando su balance microbiano intestinal (Fuller, R; 1989).

Microorganismos vivos que, luego de la ingestión en cierto número, ejercen un efecto beneficioso más allá de la nutrición básica (Schaafsma, 1996).

Microorganismos vivos que, administrados en cantidades adecuadas, ejercen un efecto beneficioso en el huésped que los consume (FAO/WHO, 2002).

Efectos beneficiosos de probióticos

- * estimulan la respuesta inmunitaria
- * mejoran balance microbiano colónico
- * adyuvantes
- * reducción de enzimas fecales
- * tratamiento en diarrea del viajero y por antibióticos
- * antagonismo con patógenos que se transmiten por alimentos

Cepas probióticas

- * *Lactobacillus*
- * *Bifidobacterium*
- * *Enterococcus*

- * *Escherichia*
- * *Bacillus*
- * *Saccharomyces*

Los microorganismos que puedan ser seleccionados como probióticos deben provenir de la misma especie animal en la cual ejercerán su función y deben tener la capacidad de sobrevivir y crecer en su respectivo nicho ecológico

Condiciones de probióticos

- * no poseer efecto patogénico
- * adherirse al tejido epitelial del tracto gastrointestinal
- * excluir o reducir la adherencia de patógenos
- * producir sustancias antimicrobianas
- * presentar resistencia a ácidos gástricos y bilis
- * persistencia en el tracto gastrointestinal
- * no ser invasivos ni carcinogénicos
- * colaborar en el mantenimiento de una flora normal balanceada

Probióticos en bovinos

Inhibir *E. coli* O157:H7 en TGI de bovinos

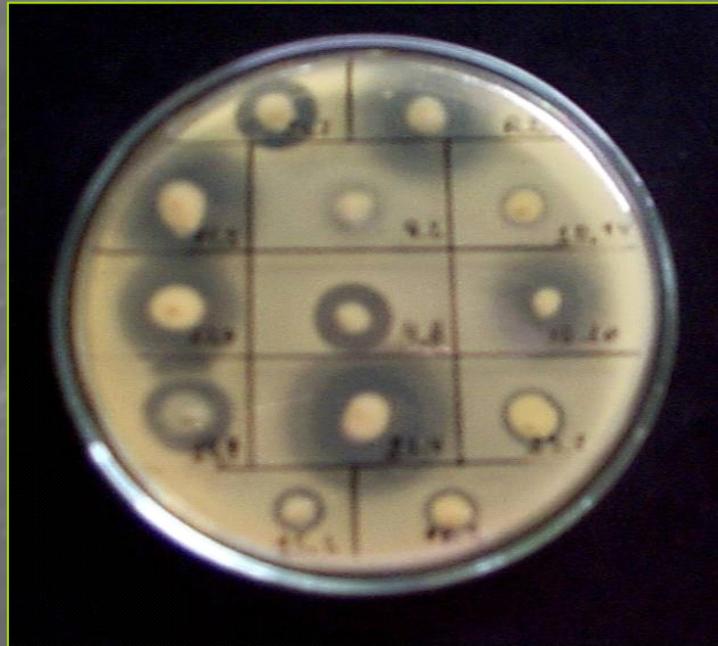
- * Bacterias ácido-lácticas (Brashears *et al.*, 2003).
- * *Escherichia coli* y *Proteus* (Zhao *et al.*, 1998).

Aislamiento de bacterias

Secciones de colon bovino obtenido en frigorífico

Ensayo de inhibición de crecimiento de *E. coli* O157:H7

Medición de halos de inhibición.

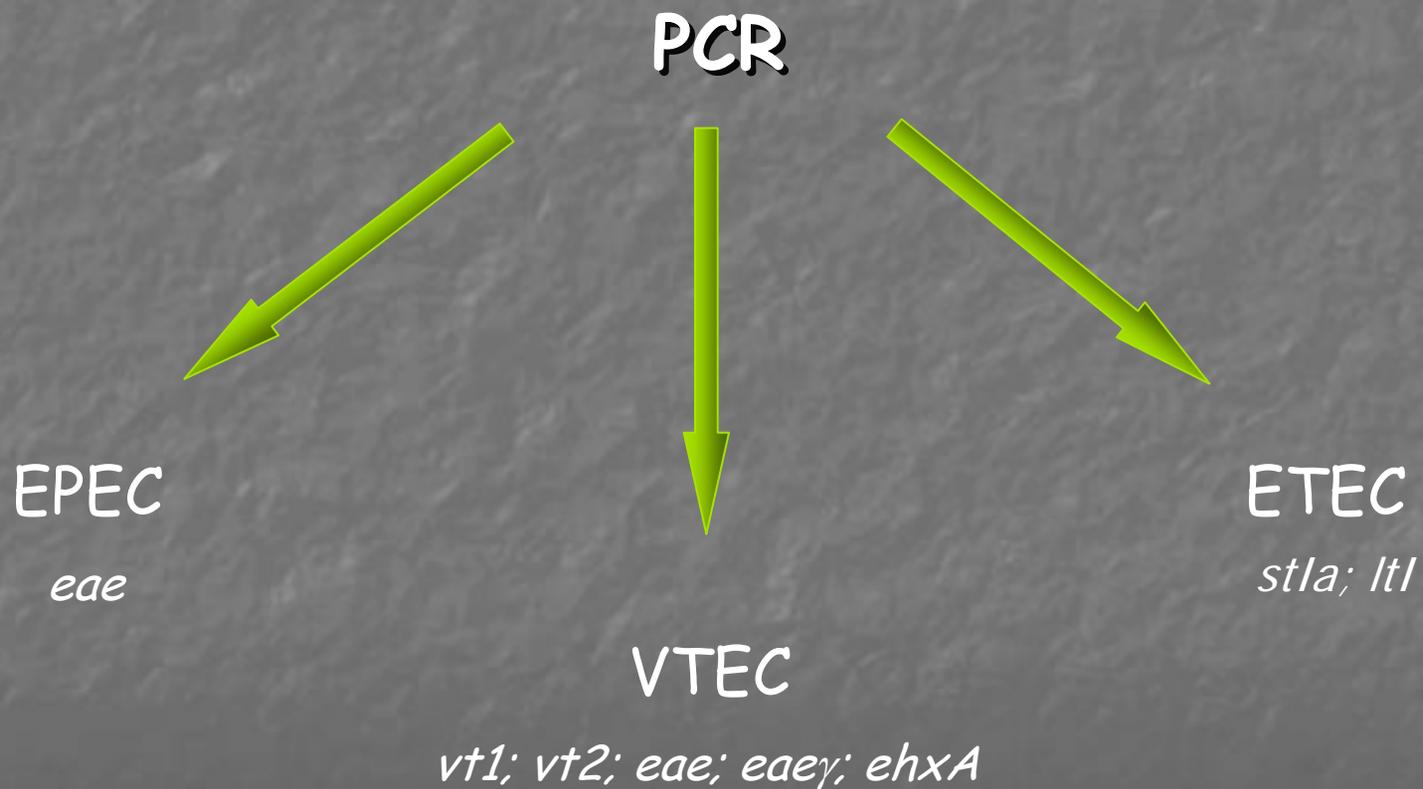


Identificación Bioquímica

Escherichia coli

Sorbitol positivas (SMAC)

Caracterización genotípica



PCR

VTEC -

ETEC -

EPEC -

Diferenciación bacteriocina / bacteriófago

Productoras de bacteriocinas (Colicinas)

Ensayo de inhibición de crecimiento de *E. coli* no-O157:H7

O25:H19

O91:H21

O117:H7

O20:H19

O113:H21

O175:H8

O145:H-

O171:H2

O174:H21

Sensibilidad antibióticos

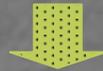
- * Ampicilina
- * Cefotaxima
- * Ciprofloxacina
- * Ceftriaxone
- * Cloranfenicol
- * Gentamicina
- * Imipenem
- * Trimetroprima-Sulfametoxasol

Sensibilidad antibióticos

Antibiótico	Bacterias productoras de colicinas						
	1	2	3	4	5	6	7
Ampicilina	S	S	S	S	S	S	S
Cefalotina	S	R	R	I	S	R	R
Cefotaxima	S	S	S	S	S	S	S
Ciprofloxacina	S	S	S	S	S	S	S
Cloranfenicol	S	S	S	S	S	S	S
Gentamicina	S	S	R	I	S	S	S
Imipenem	S	S	S	S	S	S	S
TMS	S	S	S	S	S	S	S

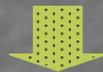
S=sensible; R=resistente; I=intermedio.

Resistencia a pH ácido



pH 2 - pH 3

Resistencia a sales biliares



Siembra en placas LB agar
sales biliares 0,1% hasta 1%

Siembra en LB caldo
sales biliares 0,3%

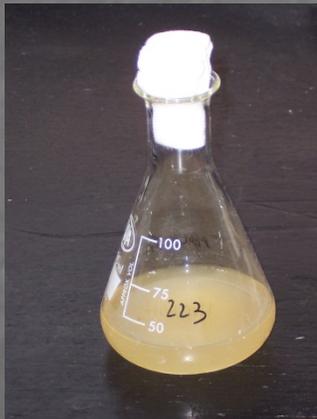
E. coli O157:H7 y *E. coli* probiótica

- * Cinética de crecimiento similar
- * Sobrevivieron en medios con pH 2 y 3 durante 6 h
- * Resistieron todas las concentraciones de sales biliares

CULTIVOS MIXTOS



Cultivo de *E. coli* O157:H7
Caldo LB 37°C 18 h
 10^9 ufc/ml



Cultivo de *E. coli* probióticas
Caldo LB 37°C 18 h
 10^9 ufc/ml

Mezclas en diferentes proporciones

- * **A** 1/10
10 μ l cultivo *E. coli* probióticas
+
100 μ l cultivo *E. coli* O157:H7

- * **B** 1/100
10 μ l cultivo *E. coli* probióticas
+
1 ml cultivo *E. coli* O157:H7

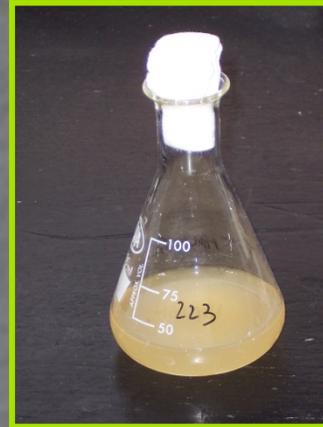
- * **C** 1/1000
10 μ l cultivo *E. coli* probióticas
+
10 ml cultivo *E. coli* O157:H7

Muestras a tiempos fijos

Tiempo 0

Tiempo 4

Tiempo 8



Tiempo 10

Tiempo 24

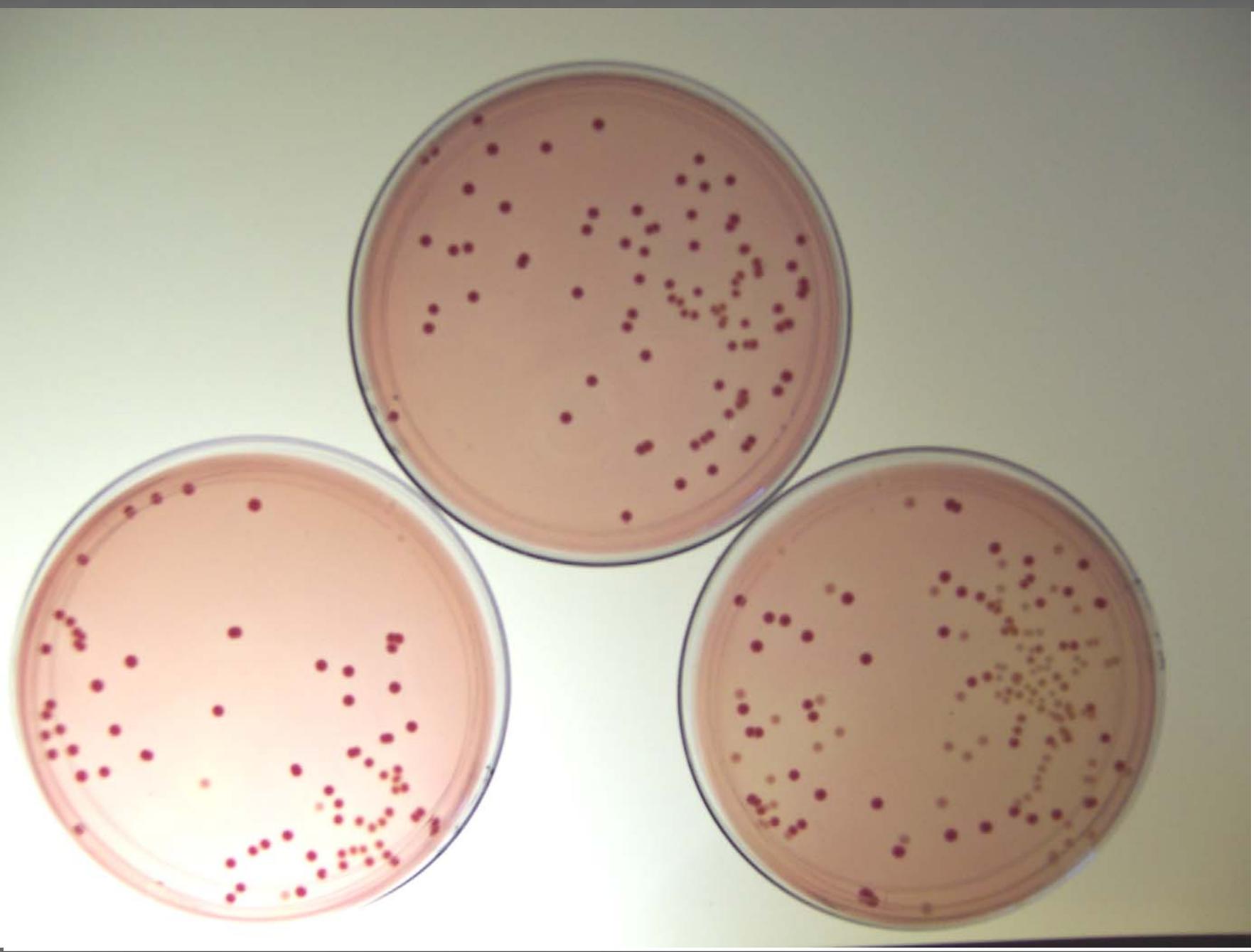
Tiempo 48

Siembra en placas de agar MacCokey sorbitol



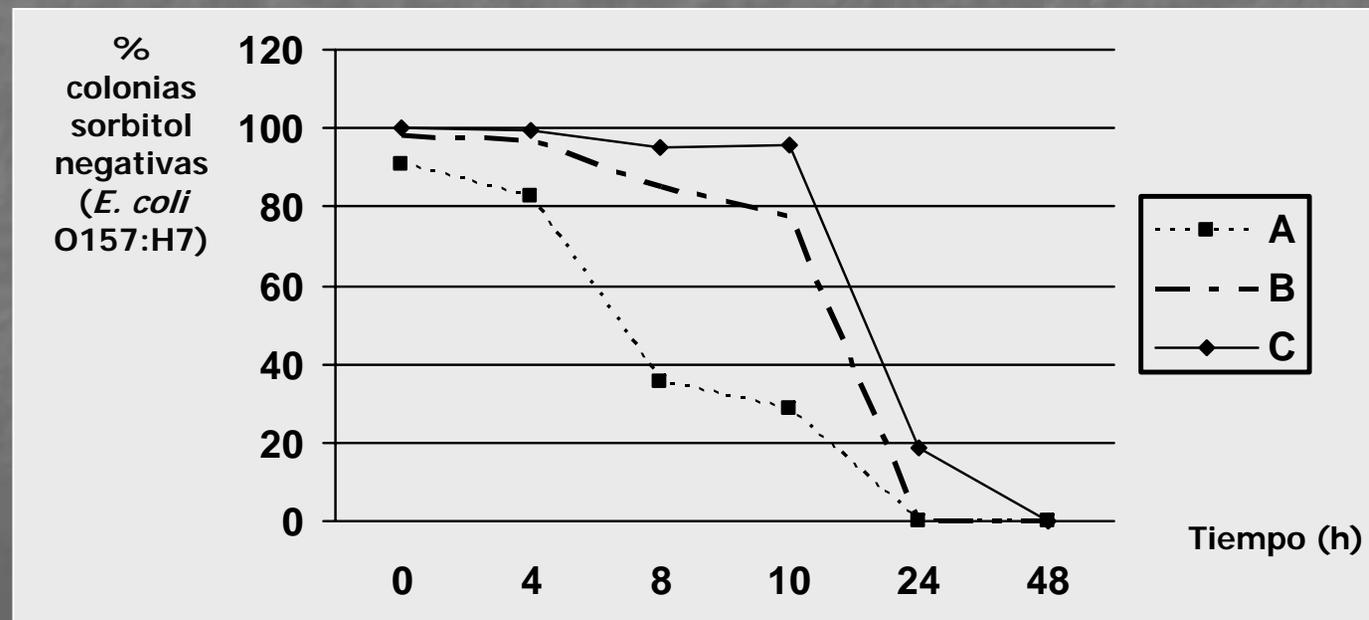
Sorbitol +
E.coli probióticas

Sorbitol -
E. coli O157:H7



Curva de resultados de cultivos mixtos

Mezcla	0	4	8	10	24	48
A	92.3	76.7	39.2	21.2	1.1	0
B	97.3	97.2	91.9	82.6	1.6	0
C	99.7	99.6	99.5	95.4	22.3	0



E. coli probiótica/ *E. coli* O157:H7 A: 1/10; B: 1/100; C 1/1000

Adherencia a cultivos celulares

Líneas celulares HEp-2

<i>E. coli</i> O157:H7 10 ⁵ ufc/ml	<i>E. coli</i> O157:H7 (10 ⁵ ufc/ml) + <i>E. coli</i> probiótica (10 ⁵ ufc/ml)
<i>E. coli</i> probiótica 10 ⁵ ufc/ml	<i>E. coli</i> O157:H7 (10 ⁵ ufc/ml) + <i>E. coli</i> probiótica (10 ⁶ ufc/ml)
	<i>E. coli</i> O157:H7 (10 ⁵ ufc/ml) + <i>E. coli</i> probiótica (10 ⁷ ufc/ml)

3 h

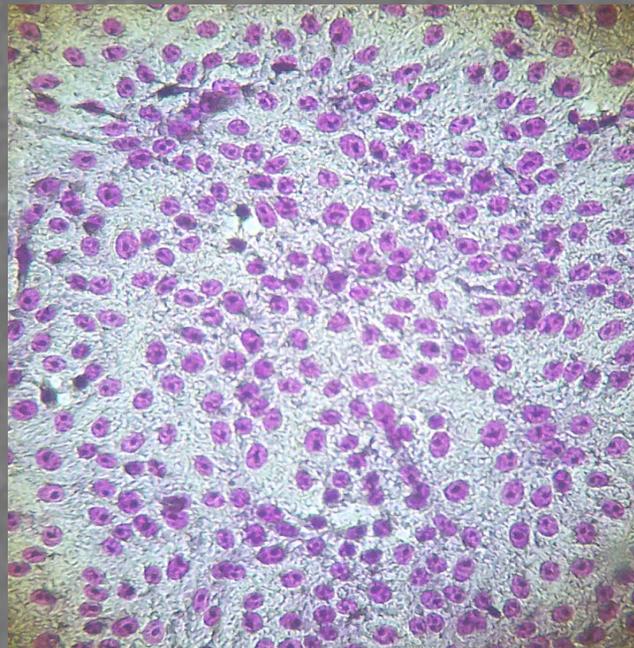
Siembra de una 100 µl de cada pocillo en placas de SMAC

Recuento de colonias sorbitol - y sorbitol +

Resultados de adherencia a HEp-2

	<i>E. coli</i> probiótica	<i>E. coli</i> O157:H7 10 ⁵ ufc/ml
<i>E. coli</i> probiótica (10 ⁵ ufc/ml)	63%	37%
<i>E. coli</i> probiótica (10 ⁶ ufc/ml)	95%	5%
<i>E. coli</i> probiótica (10 ⁷ ufc/ml)	100%	0%

Línea celular (VERO)



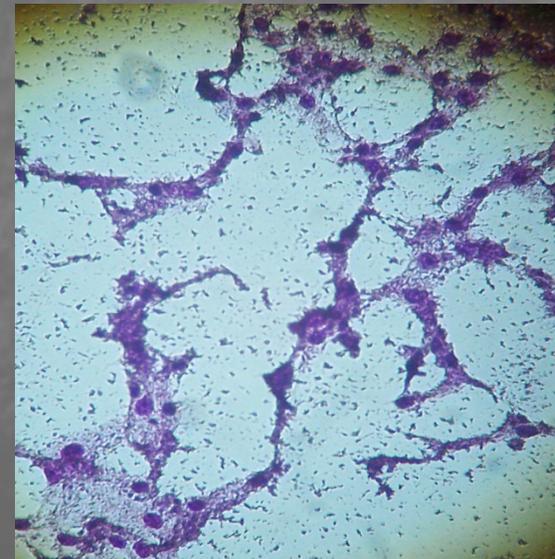
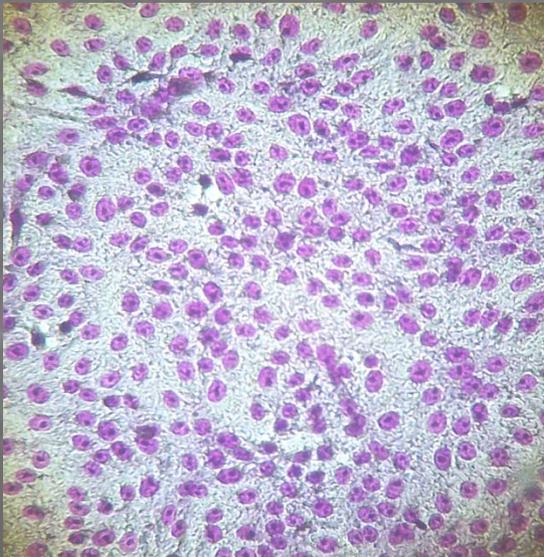
Diluciones de los sobrenadantes

24, 48, 72 h

E. coli O157:H7 10^{-7}

E. coli O157:H7 + *E. coli* probiótica 10^{-4}

E. coli probiótica



ENSAYOS *EX VIVO*

Explantos de colon bovino

E. coli O157

E. coli probiótica

E. coli O157
+
E. coli probiótica

Explantos de colon bovino

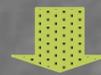


Inoculación de los explantos

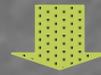
E. coli O157:H7 (25 μ l 10^7 ufc/ml)

E. coli probiótica (25 μ l 10^7 ufc/ml)

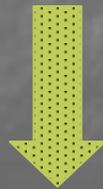
E. coli O157:H7 y *E. coli* probiótica (25 μ l 10^7 ufc/ml)



6 h - 37 °C - 5% CO₂



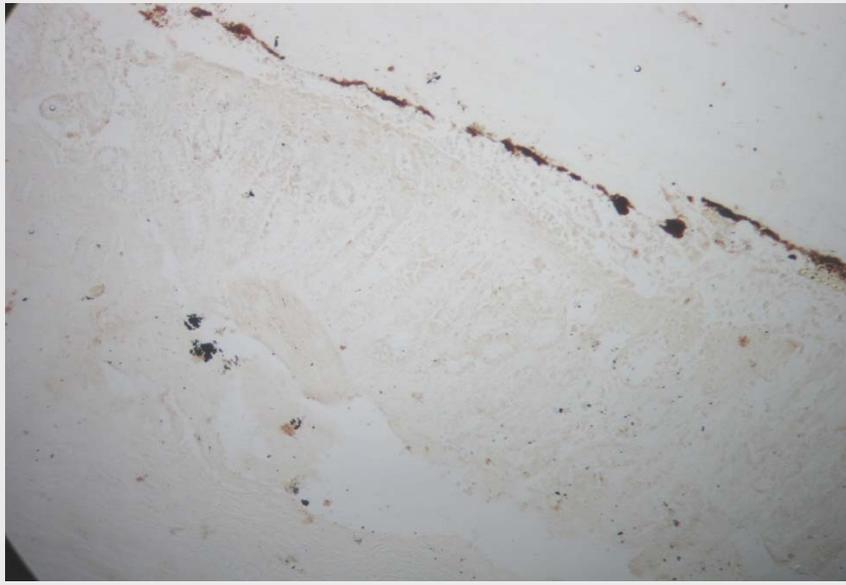
Recambio del medio de cultivo cada hora



Siembra en placas de SMAC



Inmunohistoquímica



E. coli O157:H7



E. coli probiótica



E. coli O157:H7
+
E. coli probiótica

ENSAYOS *IN VIVO*

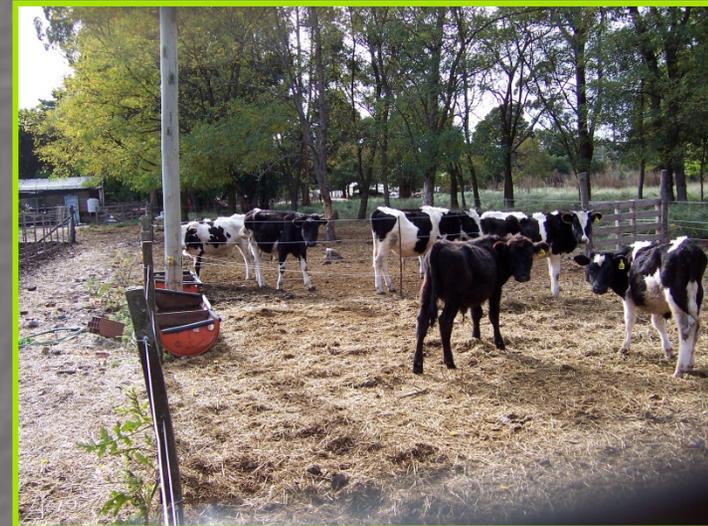
10 terneros de 8 meses





Lote 1: *E. coli* O157:H7

Lote 2: *E. coli* probiótica



Lote 3: *E. coli* probiótica
E. coli O157:H7



Inoculación de los terneros

Terneros de 10 meses

Sonda bucoesofágica



Dosis:
10 ml de un cultivo
de 10^9 ufc/ml por animal



Lavado de la sonda con 20 ml de caldo LB



Muestras post inoculación



Muestras diarios



Muestras a días alternados



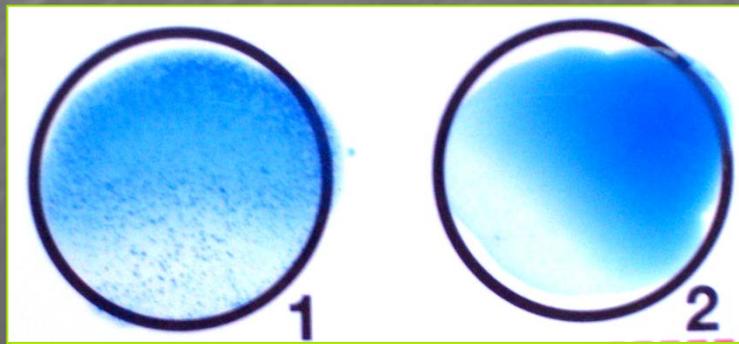
Incubación a 37°C durante 18 h



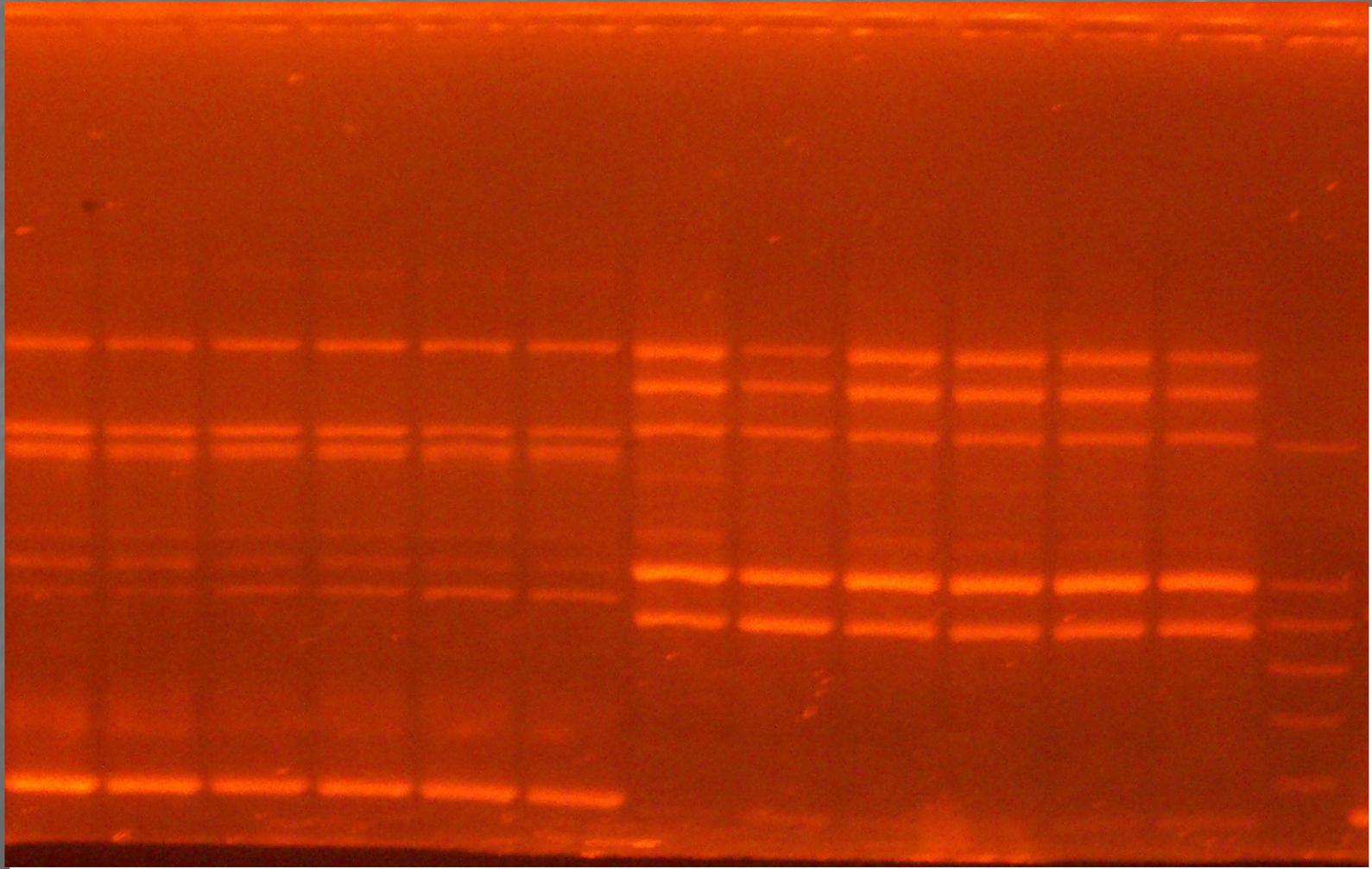
Colonias sorbitol +

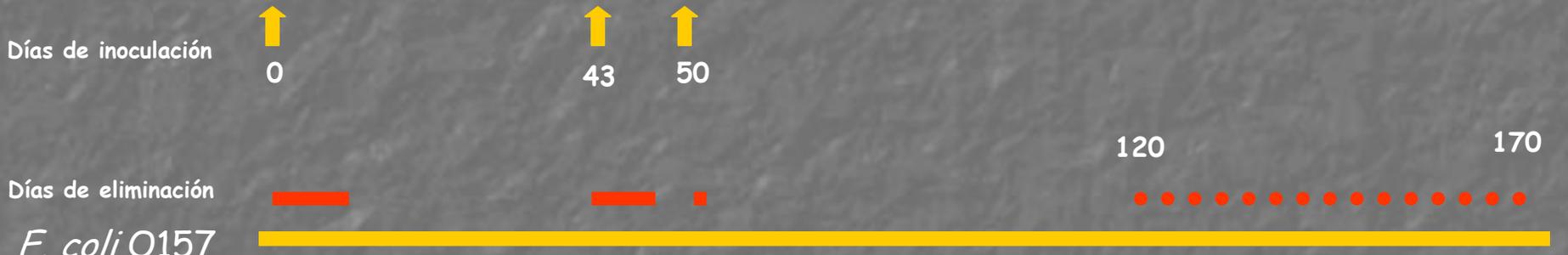
Colonias sorbitol -

Prueba de aglutinación para *E.coli* O157



RAPD





Sacrificio de los terneros





E. coli O157:H7



E. coli O157:H7 + *E. coli* probiótica

- * Se aislaron 2400 bacterias
- * Se seleccionaron 7 bacterias
 - * Productoras de colicinas
- * Genotipo VTEC - / EPEC - / ETEC -
 - * Sensibles a ATB
 - * Resistentes a ácidos y sales biliares
- * Inhibitorias de serotipos de *E. coli* O157 y no-O157

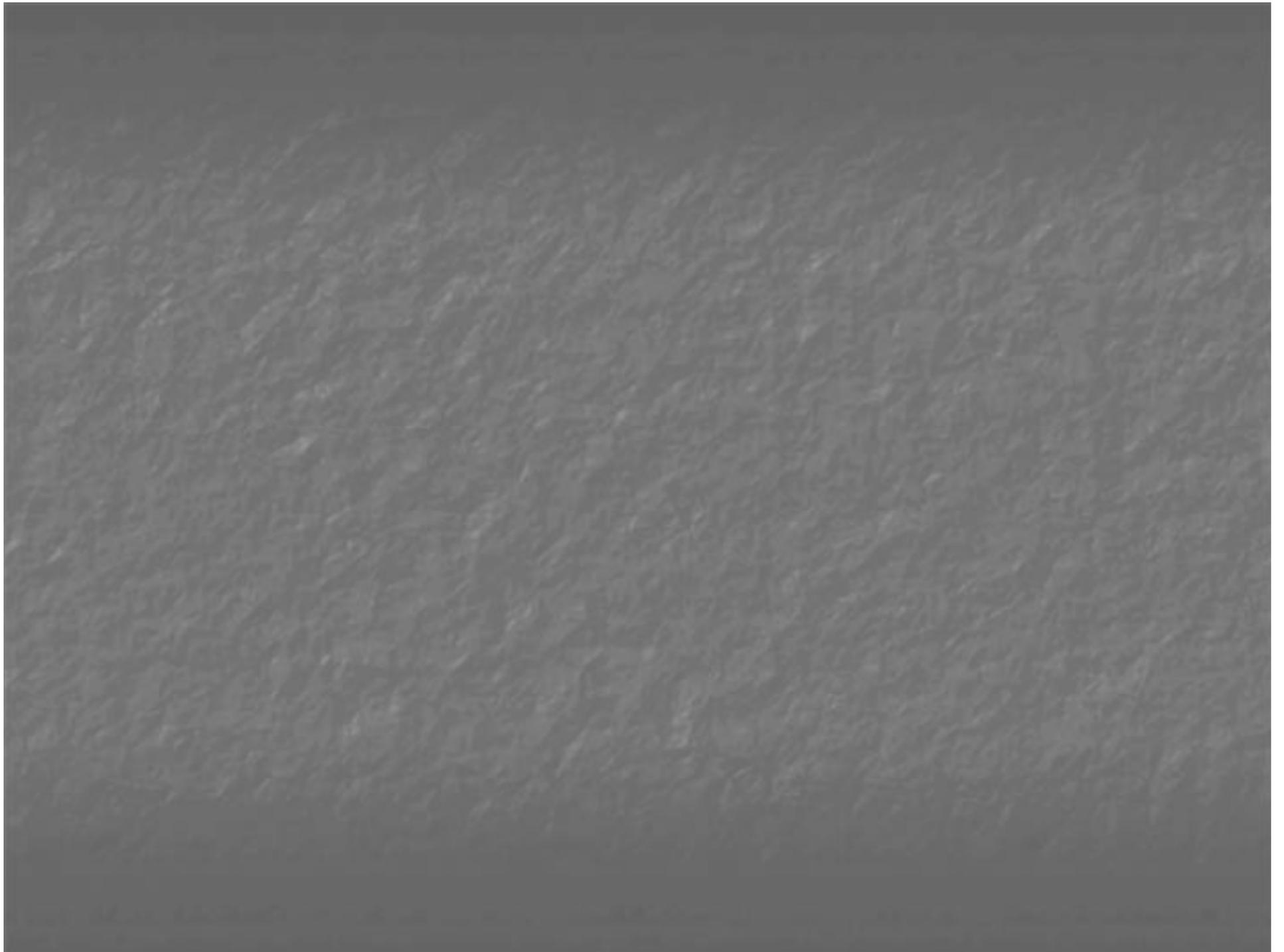
Conclusiones

- * Aislar bacterias del mismo nicho ecológico que EHEC inhibitorias de *E. coli* O157
- * Requisitos de bacterias probióticas
- * Inhibición adherencia de *E. coli* O157:H7 a explantos de colon

Conclusiones

- * Disminución de eliminación fecal de *E. coli* O157:H7 *in vivo*
- * Persistencia de *E. coli* probiótica en TGI y eliminación al medio
 - * Incorporación de *E. coli* como probióticos
 - * *E. coli* inhibitorias de *E. coli* O157:H7 y no-O157





*Integrantes Inmunquímica y Biotecnología
FCV-UNCPBA*

Director Dr Alberto E. Parma -Prof. Titular-

Grupo Reservorios y Alimentos

Dra Nora L. Padola

Prof. Adjunto-Invest CIC

Dra. Analía I. Etcheverría

Prof. Adjunto-PA CIC

Dr Daniel Fernández

Becario Posdoctoral-CONICET

Vet. Mónica Alonso

Becario Doctoral-CONICET

Lic. Rosana Polifroni

Becaria Doctoral-CONICET

M.V. Guillermo H. Arroyo

Personal Apoyo-CONICET

Lic . Rocío Colello

Becario Doctoral-CONICET

Dr Marcelo Sanz

Prof Adj. -UNCPBA

Grupo Polimorfismos genéticos

Dra Paula M. A. Lucchesi

Prof. Adjunto-Invest. CONICET

Dra Mariel Sanso

Invest. CONICET

Dra Ana Bustamante

Invest CONICET

Dra Alejandra Krüger

Invest CONICET

Lic. Claudia Granobles

Becaria Doctoral CONICET

Lic Jimena Cadona

Becaria CIC

Juliana Gonzalez

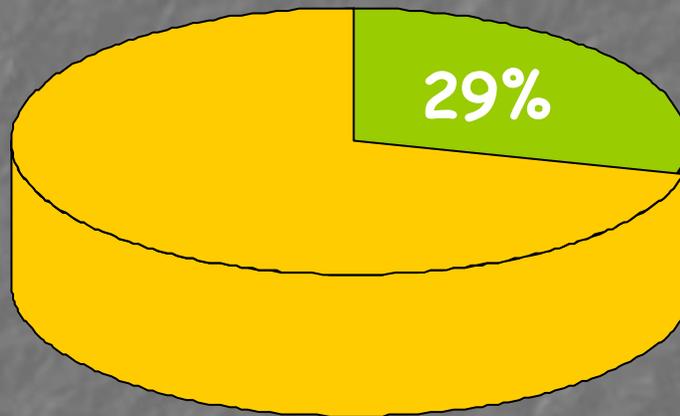
Tesinista

Claudia Cagnoli

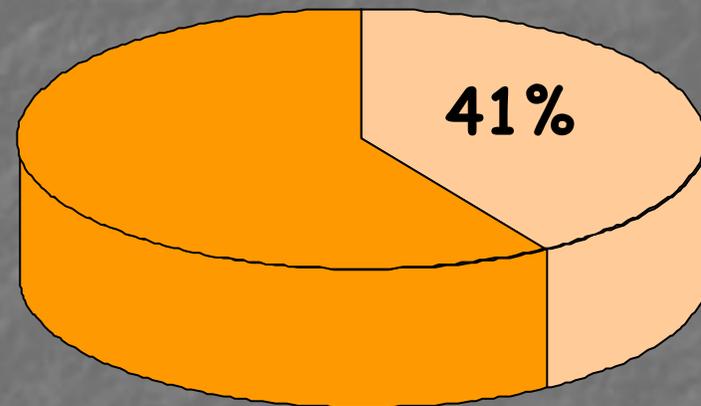
Tesinista

Técnica María Rosa Ortíz

ALIMENTOS



hamburguesas



carne picada

Bovinos Pre-faena

