

Aplicaciones de la Epidemiología Molecular en la detección de brotes de enfermedades transmitidas por alimentos. Avances en Latinoamérica

Molecular Epidemiology applications to detect illnesses transmitted by food. Latinamerican advances.

Vesna Boric Bonifaz

Laboratorio de Microbiología de Alimentos, Instituto Nacional de Laboratorios INLASA, Ministerio de Salud y Deportes. La Paz, Bolivia.

Dirección para correspondencia: Vesna Boric Bonifaz MSc. Laboratorio de Microbiología de Alimentos, Instituto Nacional de Laboratorios. c/ Rafael Zubieta N° 1889. Miraflores.

Tel: 2226670, Fax. 591-2-228254

E mail: ves_boric@yahoo.com.

RESUMEN

Las enfermedades causadas por el consumo de alimentos contaminados han surgido como una causa importante de morbimortalidad a nivel mundial. Los patógenos bacterianos que clásicamente están implicados en las ETA son *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio cholerae*, *Clostridium botulinum*, *Escherichia coli O157*, *Listeria monocytogenes* y *Campylobacter*. En América Latina las ETA representan alrededor del 70 % de los casos de enfermedad diarreica aguda, según estimaciones de la Organización Mundial de la Salud En Bolivia, el SNIS reporta en la semana epidemiológica N° 20 al 31 de Mayo de 2007, 12.849 episodios de EDAs, 23% corresponden a Santa Cruz (Dpto. de mayor notificación), las atenciones por EDA tienen un acumulado nacional de 544 224 atenciones (5773 x 103 hab.) principalmente en menores de 5 años.

Las ETA, a menudo ocurren como “brotes” y las herramientas para realizar estos análisis requieren una metodología de biología molecular que se denomina Subtipificación molecular y es la base de la “epidemiología molecular”. La electroforesis en campo pulsado (PFGE), ha sido aplicada con muy buenos resultados para la Subtipificación de muchas bacterias patógenas. Existen dos redes mundiales de vigilancia de patógenos de transmisión alimentaria: WHO Global Salmonella Surveillance WHO GSS y la Red de Subtipificación Molecular de Patógenos Transmitidos por Alimentos PulseNet, de las cuales Bolivia participa activamente, permitiendo al país incursionar en los nuevos adelantos tecnológicos y sus beneficios.

Los resultados de América Latina han permitido identificar brotes de ETA desde el año 2004, pudiendo utilizar la electroforesis en campo pulsado

PFGE como un método altamente discriminatorio, sensible y universal que contribuye a la detección de brotes de manifestación dispersa, detectar la fuente de origen y la vía de transmisión del brote, así como la circulación de cepas nuevas. Permite anticipar la aparición de brotes y esta información contribuye a la toma de decisiones. Finalmente permite generar acciones que mejoren el control e inocuidad de los alimentos, lo que favorece la Salud Pública, el comercio y el turismo.

Palabras Clave: Epidemiología molecular, PFGE, brotes, ETA, WHO GSS y PulseNet

ABSTRACT

Illnesses caused by contaminated food consuming have been marked as an important cause of mortality at a world wide level. The pathogenic organisms implicated in this illnesses are *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio cholerae*, *Clostridium botulinum*, *Escherichia coli O157*, *Listeria monocytogenes* and *Campylobacter*.

In Latin America, these illnesses represent approximately 70% of the cases belonging to diarrhea, according to data provided by WHO. In Bolivia, the SNIS reports that in the epidemiological week number 20, starting on May,31st 2007, 12.849 cases were detected, and 23% belong to Santa Cruz Department (the one with the most notification), and the medical attentions have a national accumulated number is 544244 (with an average of 5773 per laboratory), principally in people younger than 5 years old.

These illnesses often occur in the form of soft, casual appearances, and the tools to carry out the analysis require molecular biology based techniques that are named “Molecular subtypification”, which is the key

to “molecular epidemiology”. The pulsed-field electroforesis has been applied with very good results for the subtyping of many pathogenic bacteria. There are two world wide networks that surveil illnesses of food transmission: The WHO and the GSS (Global Salmonella Surveillance). Along with this, there exist the Molecular Subtyping of pathogenic organisms network, of PulseNet. Bolivia is an active participant, and this allows the country to get into new technological advances and their benefits.

The results for Latin America have allowed this laboratories to identify new appearances since 2004, being able to use the pulsed – field electroforesis as a highly discriminatory method, sensible and universal, that contributes to the detection of appearances of this illnesses of disperse manifestation, and thus, detecting the possible source of the illness. This information contributes to decision-making policies, action-generation processes, that will better the food control, which favors Public Health procedures and tourism.

Key Words: molecular epidemiology, illnesses appearances, WHO, GSS, PULSENET.

INTRODUCCIÓN

Como consecuencia de los cambios en el sistema de vida y en los hábitos alimentarios, las enfermedades causadas por el consumo de alimentos contaminados, han surgido como una causa importante de morbimortalidad a nivel mundial. Han sido descritos alrededor de 250 agentes causantes de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA), entre los que se incluyen bacterias, virus, hongos, parásitos, priones, toxinas y metales^{1,2,3}.

Las enfermedades transmitidas por alimentos son un problema cada vez mas importante a nivel internacional y en cada uno de los países, debido entre otras cosas, al intercambio comercial y a los intensos movimientos de las personas. Los patógenos bacterianos que clásicamente están implicados en las ETA son *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio cholerae*, *Clostridium botulinum* y los “nuevos” o emergentes, como *Escherichia coli O157*, *Listeria monocytogenes* y *Campylobacter*⁴.

En América Latina las infecciones transmitidas por alimentos representan alrededor del 70 % de los casos de enfermedad diarreica aguda, según estimaciones de la Organización Mundial de la Salud. Según datos reportados al SIRVETA, durante los últimos 9 años han habido 6332 reportes de brotes de ETA, provenientes de 22 países de la región, 6% del área andina, 63% del Caribe (aportando un país más de 58,71% del total de reportes), 4% de Centro América,

10% de Norte América y 17% del Cono Sur. Se han afectado en estos brotes, 230.141 personas y han fallecido 317. La frecuencia más observada de enfermos es de 2 personas por brote, lo cual es coherente con el hallazgo de que el 32% de los brotes totales ocurrieron en el hogar. El 26% de los brotes no tuvieron diagnóstico de laboratorio para identificar los agentes etiológicos. De los brotes con información de laboratorio (4686) el 45% fue por bacterias, el 21% por virus y 20% por toxinas marinas. El restante 14%, se distribuye entre parásitos, contaminantes químicos y toxinas de productos vegetales. Los tres alimentos que se asociaron con mayor frecuencia a los brotes reportados son: el agua con un 23% de los casos, los pescados con el 18% y las carnes rojas con 12%⁴.

Las enfermedades diarreicas agudas (EDAs) en países en vías de desarrollo, tienen una tasa de morbilidad en niños menores de 5 años de 39 %, con 5 millones de muertes por año.

En Bolivia, el SNIS reporta en la semana epidemiológica N° 20 al 31 de Mayo de 2007, 12.849 episodios de EDAs, 23% corresponden a Santa Cruz (departamento de mayor notificación), en el 2005 las atenciones por EDA tienen un acumulado nacional de 544 224 atenciones (5773 x 103 hab.) principalmente en menores de 5 años⁵.

El patógeno de transmisión alimentaria más estudiado a nivel clínico y alimentario, es *Salmonella*. Entre el año 2001 al 2007 se ha reportado un total de 221 casos de *Salmonella* aisladas a partir de muestras clínicas y muestras de alimentos. Las serovariedades prevalentes en el periodo 2005 al 2007 fueron: *Salmonella spp* (33,3 %), *Salmonella* Enteritidis (13,04 %), *S. Typhi* (5,79 %) y en menor proporción *S. Oranienburg*, *S. Montevideo* y *S. Saintpaul* (2, 89 %), *S. Agona*, *S. Typhimurium*, *S. Newport* (4,34 %), *S. Panama*, *S. Bredney*, *S. Edinburg*, *S. Goeteborg*, *S. Ebera*, *S. Muenster*, *S. Anatum*, *S. Paratyphi B*, *S. Infantis*, *S. Jamaica* (1,45%)⁶.

En el área veterinaria se realizaron aislamientos de *Salmonella* a partir de gallinas, las serovariedades prevalentes fueron: *Salmonella Gallinarum* (69,4 %) y *Salmonella* Enteritidis (20,6%)⁶.

Todos los aislamientos realizados a partir de alimentos demostraron un perfil de sensibilidad a Cloranfenicol, Ampicilina, Ciprofloxacina y Cotrimoxazol y no se identificaron cepas resistentes. Excepto 4 cepas: 1 cepa de *S. Agona* resistente a ampicilina y 2 cepas resistentes a Trimetoprim-sulfametoxazol y 1 cepa de *S. Enteritidis* resistente a Acido Nalidixico, el resto de las cepas aisladas de humanos fueron sensibles a Ampicilina, Cloranfenicol, Ciprofloxacina, Gentamicina, Acido

Nalidíxico, Trimetoprim- sulfametoxazol. Ninguno de los aislamientos fue relacionado con brotes⁶.

Las infecciones a menudo ocurren como “brotes”, sin embargo las nuevas tendencias en América es la detección clínica de casos aislados y no siempre confirmados por el laboratorio y comúnmente designados como “esporádicos”. Si dichos casos pudieran relacionarse entre sí, se lograría un mejor control y prevención de las ETA⁴.

El alerta clínico-epidemiológico y de laboratorio debe ser sistemático a fin de detectar aislamientos relacionados que, indiquen sospecha de brote y por ende el inicio de su investigación para encontrar la fuente de contaminación y tomar las acciones de control.

Un elemento clave para el reconocimiento y control de brotes es la capacidad de análisis de los patógenos aislados de humanos y su identificación en las probables fuentes de contaminación, hasta llegar, en lo posible a su reservorio y las vías de transmisión. Las herramientas para realizar estos análisis trascienden el diagnóstico clásico del laboratorio ya que requieren metodologías de biología molecular que permitan establecer las relaciones del DNA entre las bacterias aisladas y determinar el grado de identidad genética entre ellas para identificar el agente infeccioso causal de la patología y la fuente de infección. Esta metodología se denomina genéricamente Subtipificación molecular y es la base de una de las nuevas disciplinas: la “epidemiología molecular”⁴.

El Centro para el Control de las Enfermedades (CDC) de USA, ha desarrollado una Red Nacional de Subtipificación Molecular para la vigilancia de las ETA, que se denomina PulseNet. PulseNet se basa en la utilización de un proceso denominado electroforesis en campo pulsado (PFGE) que facilita la migración de fragmentos de DNA a través del gel de agarosa como consecuencia de un cambio constante del campo eléctrico durante la electroforesis⁴.

El PFGE ha sido aplicado con muy buenos resultados para la Subtipificación de muchas bacterias patógenas. La Subtipificación molecular realizada utilizando PFGE, tiene un protocolo básico que consiste en la lisis de las células bacterianas, la liberación del DNA cromosomal, el corte de DNA genómico con una enzima de restricción apropiada, la electroforesis de esos fragmentos de DNA, seguidos de su tinción y visualización y el análisis posterior para establecer las relaciones genéticas entre los aislamientos. Los perfiles de los fragmentos de DNA generados por PFGE son altamente discriminatorios (comparados con otros métodos basados en la Reacción en Cadena de la Polimerasa-PCR) estables y reproducibles, es por esto que se considera al PFGE

el método de elección para la epidemiología molecular de bacterias patógenas. Esta metodología convenientemente estandarizada y con adecuados controles de calidad, tiene la gran ventaja de poder ser realizada en diferentes laboratorios al mismo tiempo, las fotografías de los fragmentos de DNA obtenidos pueden ser analizados en el o los laboratorios que lo generan y enviados electrónicamente a una base de datos habilitada para comparar los perfiles de las cepas aisladas en diferentes países y regiones en tiempo real. Esta secuencia de eventos organizados en una red regional-internacional, con participación de los sectores de salud humana, animal y de alimentos, posibilita la detección temprana del brote, en particular en brotes dispersos, y la respuesta rápida y oportuna a las infecciones por patógenos bacterianos transmitidos por alimentos⁴.

La utilización de esta herramienta epidemiológica con técnicas moleculares ha permitido en los últimos años, establecer una Vigilancia Epidemiológica Molecular que ha demostrado mejorar la rapidez en la detección de brotes y por tanto, mejorar la intervención oportuna de medidas de control y prevención.

Bolivia participa activamente de dos redes mundiales de vigilancia de patógenos de transmisión alimentaria. La Red PulseNet establecida Europa, Estados Unidos, Oriente Medio, Asia, Canadá, América Latina y el Caribe (en América Latina con 13 países participantes 14 Laboratorios de referencia nacional), ha permitido obtener información en tiempo real de los diferentes brotes de ETA⁷ y la WHO GSS Red de Vigilancia de *Salmonella*.

Bolivia, gracias a su participación activa desde el 2004 en PulseNet América Latina ha podido capacitar a recursos humanos en el país para conocer los nuevos adelantos tecnológicos y sus beneficios. En ese contexto, Bolivia a través del Laboratorio de Microbiología de Alimentos del Instituto Nacional de Laboratorios de Salud INLASA, elaboró la propuesta Inicial de Subtipificación Molecular por Electroforesis de Campo Pulsado (PFGE) para la Vigilancia de Enfermedades Transmitidas por Alimentos en Bolivia, cuyo objetivo es el de obtener la primera base genética de datos de *Salmonella* aisladas a partir de muestras clínicas, alimentos y de origen veterinario en los diferentes departamentos del país.

La vigilancia de enfermedades transmitidas por alimentos, a cargo de la Unidad de Epidemiología del Ministerio de Salud, investiga la presencia de brotes de ETA en el país, y debiera articular la información generada en los laboratorios tanto del área clínica como de alimentos, para realizar una

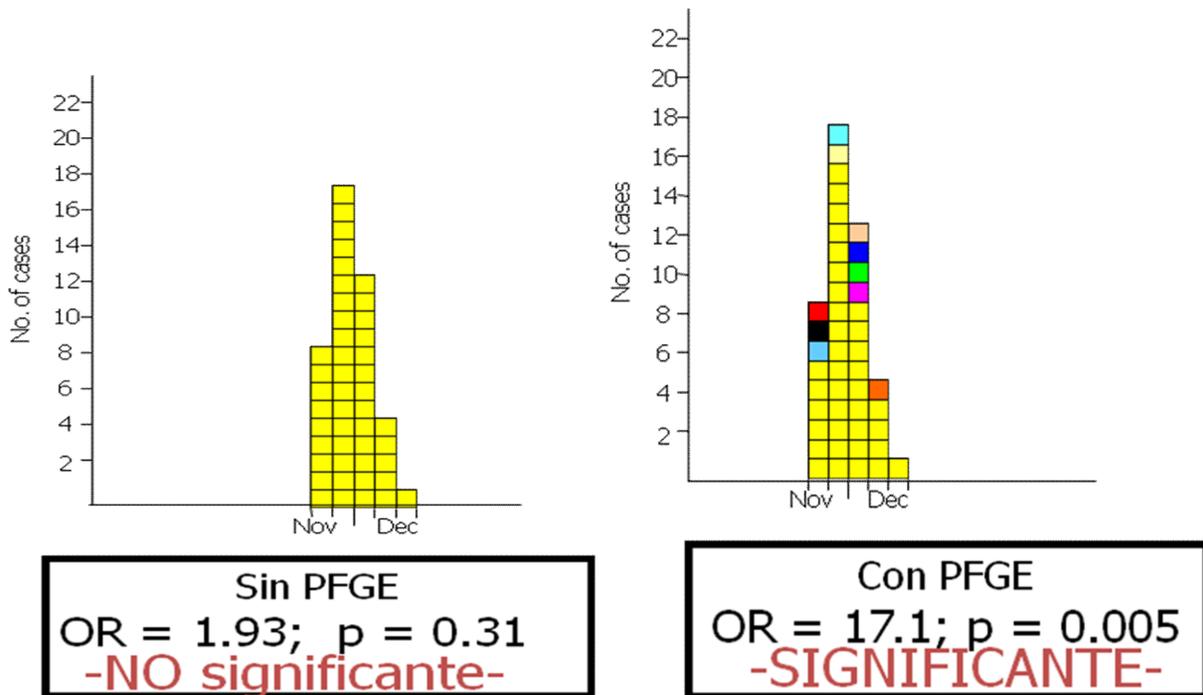
vigilancia integrada que permita mejorar el sistema de control.

Investigación de brotes de enfermedades transmitidas por alimentos

En el proceso de investigación del brote, las herramientas con técnicas moleculares permiten, subtipificar para detectar, investigar y controlar brotes de ETA, con la finalidad de: identificar al patógeno, determinar el origen/fuente, demostrar que el patógeno proviene de la fuente, describir la transmisión, relacionar casos “aparentemente” esporádicos a brotes y por tanto, dar información segura y a tiempo para desarrollar estrategias de intervención, reducir y controlar la presencia y diseminación del patógeno.

Un ejemplo de la utilidad de las técnicas moleculares en la investigación epidemiológica, se puede evidenciar en diversos brotes de ETA que por asociación estadística llegan a ser significantes cuando se utilizan estas técnicas. Como es el caso del brote por consumo de hamburguesas el año 2000 en U.S.A, en el cual la probabilidad de la ocurrencia del evento fue significativa solo utilizando la electroforesis en campo pulsado (PFGE) y no así, mediante la investigación por métodos tradicionales en la cual la probabilidad no es significativa, haciendo que se descarte el evento como un brote de ETA (Grafico 1).

Gráfico 1. Asociación Estadística con el consumo de Hamburguesa; 2000

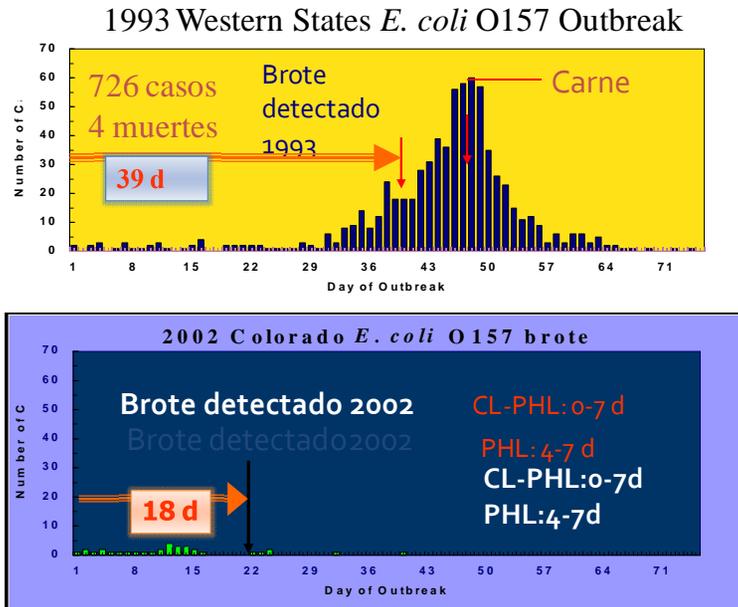


Fuente. Peter Gerner-Smidt. CDC. Atlanta

Por tanto, la epidemiología molecular ha tenido un importante impacto en la Salud Pública relacionada a la investigación de brotes de ETA, ya que ha permitido reducir prácticamente a la mitad del tiempo la conclusión en las investigaciones. Por ejemplo, un brote producido el año 1993 por *E. coli* en U.S.A. fue detectado por métodos convencionales en 39 días, con un elevado costo para la Salud Pública

de 726 casos y 4 muertes, a diferencia del año 2002 que se produjo un brote por *E. coli* 1057 en Colorado, U.S.A. el cual, utilizando técnicas moleculares como PFGE es detectado en 18 días, permitiendo a las autoridades en salud, hacer las intervenciones oportunas y evitar mayor cantidad de afectados (Grafico 2).

Gráfico 2. Impacto en la Salud Pública



Fuente. Efrain M. Ribot, Ph.D. CDC. Atlanta

Importancia de las Redes Internacionales de investigación de brotes de ETA

Red de Vigilancia para Salmonella WHO GSS

Desde el año 2000, WHO GSS (Red de Vigilancia de Salmonella) extendida prácticamente en todos los continentes, con su Centro regional para Latinoamérica en Argentina (Instituto de Referencia Nacional INEI-ANLIS "Carlos G. Malbran"), ha fortalecido las capacidades en la Región, a nivel de laboratorio mejorando el aislamiento y la caracterización de *Salmonella* y *Campylobacter*, más recientemente *Shigella* y *E. coli* O157. En el área epidemiológica se ha fortalecido con herramientas para la vigilancia e investigación en ETA (estudio de brotes, carga de enfermedad) y en la vigilancia integrada de las ETA. Se ha estimulado la interacción entre las áreas de laboratorio (clínica, alimentos y epidemiológica).

Red de Subtipificación Molecular de Enfermedades Transmitidas por Alimentos PulseNet

Desde el año 2004, la Red de Subtipificación Molecular de ETAs (PulseNet) ha fortalecido las capacidades en la región aportando con la Subtipificación de patógenos de transmisión alimentaria, una nueva herramienta para aumentar la especificidad y oportunidad en la vigilancia y el estudio de brotes de ETA como es el PFGE. En la vigilancia integrada de las ETA, se han incorporado datos de epidemiología molecular.

Logros en América Latina

Los resultados en América Latina, gracias a WHO GSS y PulseNet, han permitido identificar brotes de ETA desde el año 2004, pudiendo asociar los agentes etiológicos con mayor precisión con la utilización de la electroforesis en campo pulsado PFGE.

PulseNet América Latina ha permitido obtener resultados de la Vigilancia y brotes de ETA entre el 2004 y 2006 identificando 134 brotes producidos por *Salmonella* Typhi, *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* y otras, de los cuales 64 (48%) fueron confirmados mediante PFGE y 39 brotes producidos por *Shigella flexneri*, *S. sonnei* y *S. boydii* de los cuales 11(28%) se identificaron con PFGE. Entre los años 2006 y 2007 se realizaron 745 aislamientos de *Salmonella* de diferentes etiologías, 619 aislamientos de *Escherichia coli* tanto O157 como no-O157 y 213 aislamientos de otros patógenos transmitidos por alimentos como *Campylobacter* y otros⁷.

Metas de las Redes WHO GSS y PulseNet

El objetivo es lograr que todos los países puedan prevenir y controlar estas enfermedades. Además, promueve la vigilancia integral basada en laboratorio y la coordinación intersectorial de las áreas humana, veterinaria y de alimentos, fortaleciendo la capacidad de los países de detectar, dar respuesta y prevenir las ETA y otras enfermedades entéricas infecciosas.

Para la Red PulseNet, la meta es reducir las Enfermedades de Transmisión Alimentaria

promoviendo la utilización de Técnicas Moleculares para el diagnóstico y tipificación de patógenos a fin de fortalecer la vigilancia y el sistema de respuesta en tiempo real.

Para Bolivia, las metas son:

- Fortalecer el sistema de Vigilancia Epidemiológica de Enfermedades transmitidas por alimentos (VETA) integrado, unificando el área clínica, microbiología de alimentos, veterinaria, Organismos Oficiales de Control y Vigilancia, Servicios de epidemiología y estadística, para obtener, recolectar y analizar la información necesaria y actualizada de las notificaciones de ETAs,
- Incursionar en la electroforesis en campo pulsado.
- Continuar participando activamente de ambas redes bajo un programa integrado con Servicios de Epidemiología y estadística que recolecten datos relevantes y factores asociados.
- Integrarnos en proyectos regionales para América Latina acorde a las políticas y necesidades detectadas en el país.
- Obtener nuestra primera base de datos genética de *Salmonella* circulantes en el país, en el año 2009, en colaboración con el Instituto Nacional Carlos G. Malbran de la Argentina como Laboratorio Coordinador Regional para América Latina.

Potencialidades

- EL PFGE es un método altamente discriminatorio, sensible y universal que contribuye a la detección de brotes de manifestación dispersa, poco evidentes y permite trabajar con una técnica estandarizada para detectar la fuente de origen y la vía de transmisión del brote, así como la circulación de cepas nuevas.
- PFGE es una técnica usada por casi todos los laboratorios de la red Pulse Net internacional y establece la ventaja de conectar a los países participantes porque:
 - Permite comparar las cepas circulantes en los distintos países y entre los estados de un mismo país.
 - Permite mapeo de cepas por grandes regiones.
 - Permite anticipar la aparición de brotes.
 - Aumenta la posibilidad de trazar e identificar los factores de riesgo.
 - La información contribuye a generar acciones que mejoren el control e inocuidad de los alimentos, lo que favorece la Salud Pública, el comercio y el turismo.
- Permite fortalecer la interacción entre las áreas de epidemiología y laboratorios intra e interpaíses.
- Contribuye al desarrollo tecnológico.
- Promueve la investigación y la difusión.
- La información puede ser transmitida por Internet con lo cual se agiliza la comunicación entre laboratorios y entre la aparición de un brote.
- La red PulseNet permitirá desarrollar evidencia del impacto en salud pública y en bienestar social derivado de la implementación de técnicas moleculares como apoyo del sistema de vigilancia epidemiológica de las ETA⁴.
- Actualmente, los países participantes reconocen que existe información preliminar para el inicio de estudio de carga de enfermedad en ETA.
- Solicitan al programa GSS apoyo en el desarrollo e implementación de protocolos.
- Proponen el desarrollo de la vigilancia integrada en enfermedades transmitidas por los alimentos⁷.

REFERENCIAS

1. Mead P, Slutsker L, Dietz V, McCaig LF, Bresee JS, Shapiro C et al. Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis.* 1999; 5: 607-25.
2. Archer DL, Kvenberg JE. Incidence and cost of foodborne diarrheal diseases in the United States. *J Food Protect.* 1985; 48: 887-94.
3. Todd ECD. Preliminary estimates of costs of foodborne disease in the United States. *J Food Protect.* 1989; 52: 595-601.
4. Grupo de trabajo de la Red PulseNet, OMS, CDC, INEI. Reunión Exploratoria para la Creación de la Red Pulse-Net en Sub-tipificación Molecular en América Latina para la Vigilancia de Enfermedades Transmitidas por los Alimentos; 2003.
5. Servicio Nacional de Información SNIS.
6. Red Oficial de Laboratorios de Análisis de Alimentos RELOAA. Informe de los Laboratorios de Microbiología de Alimentos INLASA, Red Nacional de bacteriología Clínica. Laboratorio Referencia Nacional de bacteriología Clínica. INLASA, Laboratorio de Investigación y Diagnóstico Veterinario de Cochabamba LIDIVECO; 2008.
7. Pichel M. II Curso Avanzado WHO Global Salmonella Surveillance (WHO-GSS) Primer Taller WHO-GSS / PulseNet. Servicio Enterobacterias. INEI – ANLIS “Carlos G” . Malbr