

ESCHERICHIA COLI VEROCITOTOXIGÉNICA

RESUMEN

Escherichia coli es una bacteria habitual en el tracto gastrointestinal de los animales y de los humanos. Algunas cepas se han adaptado muy bien para producir diarreas y diversas enfermedades intestinales. Desde 1977, se sabe que algunas cepas que ocasionan diarreas de *E. coli* producen toxinas que tienen un efecto citopático irreversible sobre células Vero cultivadas. Las cepas verocitotoxigénicas de *E. coli* (VTEC) pertenecen a más de 100 serotipos diferentes. *Escherichia coli* 0157:H7 es el serotipo predominante y más virulento en un subtipo patógeno de VTEC, llamado *E. coli* enterohemorrágico (EHEC). Esta designación se basa en su capacidad para producir colitis hemorrágica y el síndrome de la uremia hemolítica en humanos, su habilidad para producir verocitotoxinas, para unirse y producir lesiones de eliminación de células epiteliales y en que poseen un plásmido grande característico. En las dos décadas pasadas, la VTEC 0157:H7 ha adquirido importancia mundial como problema de salud pública. Otros serogrupos distintos del 0157, incluyendo 026, 091, 0103, 0104, 0111, 0113, 0117, 0118, 0121, 0128 y 0145, se han asociado con brotes ocasionales de la enfermedad en humanos y otros se pueden asociar con casos esporádicos. Los rumiantes son el principal hospedador natural de la VTEC y son, por lo general, portadores sanos de los microorganismos. La VTEC también se ha aislado de cerdos, gatos, perros, pollos y aves salvajes. Se considera que el ganado vacuno es el reservorio principal de *E. coli* 0157:H7 para la infección en el hombre. A pesar de su patogenicidad para los humanos, la infección de animales con *E. coli* 0157:H7 es invariablemente asintomática. Como contraste, los serogrupos EHEC 026, 0111 y 0103 pueden ser patógenos tanto para los humanos como para los animales. La presencia de VTEC en heces de animales proporciona el potencial para que estos microorganismos entren en la cadena alimentaria por la contaminación fecal de productos lácteos, contaminación de la carne con contenidos intestinales durante el proceso del sacrificio o contaminación de la fruta y los vegetales por contacto con abono infectado. Las VTEC se transmiten también a través del agua contaminada y por contacto directo con personas o con animales infectados.

Identificación del agente: Se han desarrollado procedimientos de diagnóstico para las VTEC, fundamentalmente para *E. coli* 0157:H7, que intentan superar los problemas relacionados con el aislamiento de cantidades bajas de los microorganismos de productos complejos, tales como las heces animales, muestras clínicas y alimentos. La identificación de *E. coli* 0157:H7 en portadores animales subclínicos depende del enriquecimiento de muestras de heces en medios líquidos, generalmente agua tamponada con peptona con o sin adición de vancomicina, cefsulodina y cefixima, durante 6 horas a 37°C seguida de la separación inmunomagnética usando partículas paramagnéticas disponibles comercialmente o bolas recubiertas con anticuerpo anti-lipopolisacárido 0157. Las bolas con bacterias ligadas se colocan en agar selectivo, normalmente agar MacConkey con un 1% de sorbitol que contienen cefixima y telurito potásico, y se incuban durante 18 horas a 37°C. Las colonias que no fermentan sorbitol se confirman bioquímicamente como *E. coli* y, mediante pruebas de aglutinación de suero o látex, como poseedoras del antígeno somático 0157 y/o el antígeno flagelar H7. La virulencia potencial para los humanos se confirma demostrando la producción de verocitotoxina mediante un ensayo en células Vero, el ensayo inmunoenzimático (ELISA), pruebas de aglutinación o por la demostración de los genes que codifican la verocitotoxina mediante la reacción en cadena de la polimerasa. La detección de la VTEC no-0157 descansa en el análisis directo de colonias sobre placas no selectivas mediante, por ejemplo, inmunotransferencia o sondas de ADN para la producción de verocitotoxinas. Se han descrito numerosas pruebas inmunológicas y de reconocimiento del ácido nucleico para proporcionar un diagnóstico preliminar más rápido de la VTEC y hay muchas disponibles

comercialmente. La tipificación del fago y la electroforesis en gel de campo pulsante se utilizan ampliamente en laboratorios de referencia para subtipificar la VTEC 0157 con fines epidemiológicos.

Pruebas serológicas: Las pruebas serológicas no se usan rutinariamente en animales para diagnosticar la infección por VTEC, pero se ha demostrado que el ganado vacuno infectado con la VTEC produce anticuerpos séricos al lipopolisacárido 0157 que pueden detectarse mediante ELISA.

Requisitos para las vacunas y el material de diagnóstico: No existen en la actualidad vacunas disponibles para controlar las infecciones por VTEC en animales o humanos, pero se están desarrollando algunas vacunas experimentales.

A. INTRODUCCIÓN

Escherichia coli se encuentra habitualmente en el tracto gastrointestinal de los animales y de los humanos, en los que algunas cepas se han llegado a adaptar para producir diarrea y varias enfermedades intestinales adicionales. *Escherichia coli* se caracteriza rutinariamente por la identificación serológica de los antígenos O somáticos, H flagelares y K capsulares. Sin embargo, mientras que algunos serotipos se correlacionan completamente con algunos síndromes clínicos, la diferenciación de cepas patógenas de la flora normal depende de la identificación de las características de virulencia. Desde 1977, se ha reconocido que algunas cepas diarreas de *E. coli* producen toxinas que tienen un efecto citopático irreversible sobre las células Vero cultivadas (Konowalchuk *et al.*, 1977). Se ha demostrado que *E. coli* verocitotoxigénica pertenece a más de 100 serotipos diferentes (Johnson *et al.*, 1996a; Strockbine *et al.*, 1998). También se la ha descrito como *E. coli* productora de la toxina Shiga (STEC) debido a la similitud demostrada entre las verocitotoxinas (VT) y las toxinas Shiga (stx) de *Shigella dysenteriae* (O'Brien & Laveck, 1983). En las dos últimas décadas ha aumentado la importancia a escala mundial de la VTEC 0157:H7 como problema de salud pública. *Escherichia coli* 0157:H7 es el serotipo predominante y más virulento en un subtipo patógeno de la VTEC, designado *E. coli* enterohemorrágico (EHEC). Esta designación se basa en su capacidad para producir colitis hemorrágica y el síndrome de uremia hemolítica en humanos, su habilidad para producir VT, para causar uniones y lesiones de eliminación de células epiteliales, y en que tiene un plásmido grande característico (Nataro & Kaper, 1998). Otros serotipos no-0157, incluyendo 026:H11, 0104:H21, 0111: H- y 0145: H-, se han asociado con brotes de la enfermedad en humanos, y otros más con casos esporádicos (Johnson *et al.*, 1996a).

Los rumiantes son los principales hospedadores naturales de la VTEC y, por lo general, son portadores sanos de los microorganismos. La VTEC se ha aislado también de cerdos, gatos, perros, pollos y aves salvajes. Estas especies pueden ser colonizadas de forma transitoria por los microorganismos (Beutin *et al.*, 1993; Johnson *et al.*, 1996a). Se ha descrito que las cepas 0157 representan normalmente una minoría de las VTEC que colonizan el tracto intestinal de los animales. La presencia de la VTEC en heces de animales proporciona el potencial para que estos microorganismos entren en la cadena alimentaria por contaminación fecal de la leche, contaminación de carne con contenidos intestinales durante el sacrificio o contaminación de fruta y vegetales por contacto con abono contaminado. La VTEC se transmite también a través del agua y por contacto directo con personas infectadas, animales o desechos animales. El agua contaminada utilizada para regar o lavar las verduras también puede ser fuente de infección para humanos o animales. Se considera que el ganado vacuno es el mayor reservorio de *E. coli* 0157:H7 de infección para los humanos, aunque el microorganismo se ha aislado de algunos animales domésticos, caballos, perros, conejos, pájaros y moscas. A pesar de su habilidad para causar la enfermedad grave en humanos (Paton & Paton, 1998), la infección de animales con *E. coli* 0157:H7 es invariablemente subclínica. Sin embargo, algunos serotipos no-0157, son patógenos para los animales y los humanos e incluyen 026:H11; 0103:H2; 0111: H- (Bettelheim, 2000; Johnson *et al.*, 1996a).

La VTEC se asocia también con la enfermedad de los edemas en los lechones, con cuatro serotipos responsables de la mayoría de los brotes mundiales, a saber, 045: K+, 0138:K81, 0139:K82 y 0141: K-. Los principales factores de virulencia son las adhesinas de las fimbrias, F18, implicadas en la colonización, y la toxina VT2e, que es responsable de los síntomas clínicos. Se ha demostrado un alto grado de relación genética entre las cepas 0101 que albergan genes stx2e de origen humano y porcino. Se requiere más investigación del papel de los cerdos como portadores subclínicos de STEC en la epidemiología de la enfermedad humana.

Debido a que *E. coli* 0157:H7 se ha convertido en la VTEC zoonótica predominante, se han desarrollado métodos de diagnóstico para detectar este serotipo selectivamente en casos clínicos humanos (Strockbine *et al.*, 1998) y en fuentes alimentarias (Vernozy-Rozand, 1997). Para el segundo de los casos, está disponible un método de detección internacional estándar y validado (EN ISO 16654:2001). Sin embargo, en este capítulo se pondrá de relieve el aislamiento y la identificación de 0157 y otras VTEC de animales portadores (Clifton-Hadley, 2000).

B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

1. Identificación del agente

1.1. Muestras

En la mayoría de los casos, las muestras tomadas de animales para el aislamiento de VTEC son las heces recogidas con fines de inspección o como parte de una encuesta epidemiológica después de un brote de enfermedad en humanos. Las muestras se pueden tomar del recto o de heces recién evacuadas en la granja o de contenidos intestinales después del sacrificio. Existe una variedad de VTEC presente en animales sanos y no se cree que todas sean patógenas para los humanos. *Escherichia coli* 0157:H7, que es la VTEC más significativa en la enfermedad humana, se presenta subclínicamente en animales. Se cree que el ganado vacuno es el reservorio más importante de este serotipo. En un rebaño infectado, solo se puede detectar una proporción de animales infectados, y el organismo está presente en los portadores en pequeñas cantidades y es eliminado a través de las heces intermitentemente. En esa eliminación influye la edad de los animales, la dieta, el estrés, la densidad de la población, la localización geográfica y la estación (Meyer-Broseta *et al.*, 2001). Se cree que algunos animales contribuyen a la infección de forma desproporcionada, por lo que se les ha calificado de “super-propagadores” (Matthews *et al.*, 2006). Los índices de aislamiento se deben mejorar tomando muestras de heces mejor que frotis rectales, aumentando el tamaño de la muestra, el número de individuos muestreados y repitiendo el muestreo. Se ha informado de que el uso de frotis de la mucosa del recto y del ano mejora la detección del ganado colonizado como distinta a la del ganado infectado de forma transitoria (Rice *et al.*, 2003). Se deben tomar precauciones para evitar la contaminación cruzada de las muestras manejadas y en el laboratorio. Las muestras deben mantenerse frías y cultivarse lo antes posible después de la recogida.

1.2. Seguridad

Ha de tenerse cuidado cuando se manejan muestras positivas de VTEC, ya que las dosis infectivas capaces de producir infección grave en humanos pueden ser bajas (posiblemente 100 microorganismos para VTEC 0157:H7) y se han descrito infecciones adquiridas en el laboratorio (véase el Capítulo 1.1.4 *Bioseguridad y bioprotección: norma para la gestión del riesgo biológico en el laboratorio veterinario y en las instalaciones de los animales*).

1.3. Aislamiento

1.3.1. Enriquecimiento de medios líquidos

Las muestras clínicas se colocan rutinariamente sobre medios líquidos para el aislamiento de *E.coli*, pero el número de microorganismos objetivo en las heces de portadores sanos es generalmente bajo y el enriquecimiento de medios líquidos mejora la recuperación. Normalmente, los medios enriquecidos utilizados son el agua tamponada con peptona sin suplementar (lo que permite una buena recuperación) o suplementada con 8 mg/litro de vancomicina, 10 mg/litro de cefsulodina y 0,05 mg/litro de cefixima (BPW-VCC) para suprimir el crecimiento de los microorganismos Gram positivos, *Aeromonas spp.* y *Proteus spp.*; el caldo de soja tripticasa modificado (mTSB) suplementado con 20 mg/litro de novobiocina o 10 mg/litro de acriflavina para reducir el crecimiento de microorganismos Gram positivos; o el caldo de *E. coli* modificado con 20 mg/litro de novobiocina (mEC+n). *E. coli* EHEC crece mal a 44°C. La incubación óptima para minimizar el crecimiento excesivo de otros microorganismos es la de 6 horas a 37°C para heces bovinas. Para muestras de carne, se usa el enriquecimiento durante 6 horas a 41–42°C, y para el agua y los productos lácteos, 24 horas a 41–42°C. Se necesita el pre-enriquecimiento no selectivo para la recuperación efectiva de niveles bajos de *E.coli* 0157. Los caldos enriquecidos se deben precalentar para impedir que los microorganismos sufran un choque por frío y ralenticen su crecimiento inicial; la incubación durante 24 horas puede aumentar la recuperación si los microorganismos están bajo la influencia de algún factor que los altere.

1.3.2. Separación inmunomagnética

Se ha utilizado la separación inmunomagnética (MS) como técnica de concentración selectiva para mejorar el aislamiento de *E. coli* 0157:H7 donde la cantidad de microorganismos es baja (Chapman *et al.*, 1994). Las partículas paramagnéticas disponibles comercialmente o bolas recubiertas con anticuerpo anti-lipopolisacárido (LPS) se mezclan con una alícuota del caldo incubado. Las bolas con bacteria ligada se separan del sobrenadante mediante un campo magnético y, después del lavado, se ponen sobre un agar selectivo y se incuban durante

18 horas a 37°C para aislar las colonias sospechosas. La técnica es específica de serogrupo. Hay sistemas comerciales disponibles para la separación automática o manual (Chapman & Cudjoe, 2001). La recuperación puede estar afectada por la relación entre bola y organismo (la óptima es 3:1), el caldo enriquecido usado y el problema de adsorción no específica de *E. coli* a las bolas magnéticas (que se puede reducir mediante el uso de una solución de fuerza magnética baja en el procedimiento de IMS y un lavado cuidadoso). Estos factores deberían tenerse en cuenta cuando se trata de maximizar la sensibilidad de la técnica para detectar *E. coli*.

1.3.3. Cultivo selectivo de *Escherichia coli* 0157

No hay características bioquímicas que distingan la mayoría de las VTEC de otras *E. coli*. Sin embargo, la incapacidad de la mayor parte de las cepas de *E. coli* 0157:H7 para fermentar D-sorbitol rápidamente y su falta de actividad beta-glucuronidasa se puede explotar durante el aislamiento e identificación de estos microorganismos. Sin embargo, las variantes menos comunes de *E. coli* 0157: H (no móviles por falta de expresión del antígeno H 7), que fermentan sorbitol y son positivas a beta-glucuronidasa, no se identificarán por aislamiento en los medios selectivos escogidos por estas características bioquímicas (Karch & Bielaszewska, 2001). El agar MacConkey que contiene 1% de D-sorbitol en lugar de lactosa (SMAC) es un medio útil y barato sobre el que crece el *E. coli* que no fermenta el sorbitol en pequeñas colonias redondas blanco-grisáceas. La selectividad se mejora mediante la adición de 0,5% de rhamnosa, y la adición de 0,05 mg/litro de cefixima (CR-SMAC) inhibe el crecimiento en exceso por *Proteus spp.* Aunque pocas colonias sospechosas requieren la prueba sobre este medio, la rhamnosa es un suplemento caro. Una modificación alternativa es la adición de 2,5 mg/litro de telurito potásico además de la cefixima (CT-SMAC), que tiene un mayor efecto inhibitorio frente a *E. coli* no-0157 y otros que no son fermentadores de sorbitol, como *Aeromonas*, *Plesiomonas*, *Morganella* y *Providencia*, que frente a *E. coli* 0157 (O'Brien & Laveck, 1983). Este es el medio más usado para aislar *E. coli* 0157.

Para distinguir el *E. coli* 157:H7 que no produce beta-glucuronidasa se utilizan medios que contengan glucurónidos cromogénicos o fluorogénicos. La hidrólisis de 4-metilumbeliferil-beta-D-glucurónido (MUG) por actividad beta-glucuronidasa produce un compuesto fluorescente visible mediante luz ultravioleta. La adición de 0,1 g/litro de 5-bromo-4-cloro-3-indoxyl-beta-D-glucurónido (BCIG) a SMAC diferencia las colonias blancas de *E. coli* 0157:H7 de las colonias azul-verdosas de los microorganismos positivos a las beta-glucuronidas y negativos al sorbitol. Se pueden encontrar medios cromogénicos y fluorogénicos disponibles comercialmente a través de la referencia de los catálogos de los medios. Mientras que se han hecho algunos avances para mejorar la selección de los medios para *E. coli* 0157:H7, las tasas de aislamiento, particularmente de los microorganismos estresados, pueden resultar afectadas negativamente por los aditivos usados. Para mitigar estos efectos, la adición de los agentes de recuperación tales como 1% de piruvato sódico a agar de soja triptona o el retraso de la exposición de las células con estrés a agentes selectivos puede ayudar a la recuperación del microorganismo (Blackburn. & McCarthy, 2000).

Se ha aislado *E. coli* 0157:H- que fermenta sorbitol (FS) en pacientes con diarrea y HUS, pero se sabe poco de la epidemiología de esta infección, y el microorganismo se ha aislado en raras ocasiones en animales, incluido el ganado vacuno (Lee & Choi, 2006). La mayoría de aislamientos de *E. coli* 0157: H- fermentadores de sorbitol (FS) son susceptibles al telurito y no pueden identificarse en CT-SMAC. El análisis microbiológico de este microorganismo es muy laborioso e implica poner sobre placas SMAC microorganismos separados por IMS (separación inmunomagnética sobre muestras) y ensayar colonias individuales FS mediante la aglutinación con látex para el antígeno 0157. Como alternativa, se ensayan los barridos de colonias mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para detectar la presencia de *vt₂*, *eae*, *rfb₀₁₅₇* y *sfpA* (véase más adelante). Luego se ensayan colonias bien separadas procedentes de cultivo positivo a la PCR mediante la hibridación de las colonias con sondas para *vt₂*, *eae* y *sfpA* o mediante inmunotransferencia de colonias utilizando un anticuerpo específico (Karch & Bielaszewska, 2001; Lee & Choi, 2006).

1.3.4. Aislamiento de otras VTEC

Las VTEC no-0157 crecen bien sobre medios que permiten el crecimiento de *E. coli*, tales como agar sangre o agar MacConkey, y la mayoría solo se pueden diferenciar de otras *E. coli* por su capacidad para producir VT. El gran número de diferentes serotipos de VTEC impide el uso de antisueros O en el examen rutinario y la identificación preliminar de colonias sobre estos medios. Se puede usar IMS para una concentración selectiva de los serogrupos 026, 0103, 0111 y 0145 de una muestra preenriquecida, como para las cepas 0157. Estos serogrupos son

los VTECs no-0157 más comúnmente asociados con la enfermedad humana y actualmente se dispone de bolas producidas comercialmente.

La incapacidad de las cepas 026 para fermentar rhamnosa ha conducido al desarrollo reciente de medios que pueden ser útiles para diferenciar *E.coli* 026 de otros microorganismos entéricos. El primero es el agar rhamnosa-MacConkey (RMAC) en el cual la lactosa del medio MacConkey es reemplazada por 10 g/litro de rhamnosa. Se considera que la adición de 2,5 mg/litro de telurito de potasio y 0,05 mg/litro de cefixima (CT-RMAC) incrementa la especificidad. El segundo es un agar de rhamnosa cromogénico que incorpora 10 g/litro de rhamnosa y 0,02 g/litro de rojo fenol en agar coliforme de ES (un medio indicador para la actividad beta-galactosidasa) al cual se añaden 0,5 mg/litro de telurito potásico y 0,05 mg/litro de cefixima. Sobre este medio, se han descrito colonias 026 de color azul marino a negro, mientras otros serotipos de *E. coli* son verdes y otras enterobacterias que no son *E. coli* son verdes, amarillas o incoloras.

Un marcador de virulencia para la VTEC potencialmente útil es la producción de enterohemolisina, que produce hemólisis de eritrocitos de oveja lavados tras su incubación durante la noche sobre agar sangre suplementado con calcio. Esta característica la comparte el 90% de las *E. coli* productoras de VT aisladas en infecciones humanas. Sin embargo, el descubrimiento de que una proporción de las VTEC causantes de la enfermedad pueden ser negativas para la producción de enterohemolisina, reduce el valor del agar de enterohemolisina para el análisis.

En la mayoría de los casos, sin embargo, el aislamiento de la VTEC descansa en el análisis directo de colonias en la placa por inmunotransferencia o sondas de ADN a fin de producir VT para identificar colonias de cara a su caracterización posterior. Primero se replican las colonias de forma que las colonias positivas puedan aislarse después de que se hayan ensayado los replicados. Las colonias se pueden transferir a membranas adecuadas (nitrocelulosa o nylon) de las que se hacen réplicas o se pasan a placas de microtitulación de 96 pocillos que contengan caldo para la replicación antes de transferir alícuotas a los filtros apropiados. Las colonias se analizan utilizando sondas de ácido nucleico o anticuerpos para identificar cualquier VTEC (Strockbine *et al.*, 1998). Hull *et al.* (1993) desarrollaron un ensayo de inmunotransferencia con mitomicina para detectar la VTEC en heces, que es lo bastante sencillo para utilizarse en laboratorios de diagnóstico rutinario. Se inoculan sobre placas de agar MacConkey diluciones seriadas de heces en caldo y se incuban durante la noche a 37°C. Utilizando técnicas estándar de réplica en placa, el cultivo de la placa con alrededor de 200 colonias se transfiere a dos filtros de nitrocelulosa, de 0,45 µm de tamaño de poro, puestos en agar Syncase con 25 ng de mitomicina/ml. Este medio induce el crecimiento vegetativo de los bacteriófagos que portan los genes para la VT y aumenta la expresión de la toxina. (Alternativamente, se pueden colocar suspensiones bacterianas o fecales directamente sobre los filtros). Se incuban las placas durante la noche a 37°C. Después se retiran los filtros de las placas, se meten en un baño de cloroformo durante 15 minutos, se bloquean durante 1 hora con leche descremada al 5% en 10 mM de Tris, 150 mM de NaCl, y 0,5% de Tween (pH 8) (TNT). Los filtros se incuban durante 1 hora con antisueros contra VT1 o VT2, se lavan 3 veces durante 5 minutos en TNT, se incuban durante 1 hora con antiinmunoglobulina G conjugada con fosfatasa alcalina, y posteriormente se realizan 3 lavados de 5 minutos en TNT. Cualquier reacción se visualiza por el desarrollo de color con nitroazul y 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato. Se prueba en paralelo *E. coli* control negativo a VT1, VT2 y VT. El uso de anticuerpos policlonales da algunos resultado positivos falsos que se eliminan utilizando anticuerpos monoclonales. Al comparar la utilización de sondas de ADN con la utilización del ensayo de inmunotransferencia de colonias con mitomicina, se demostró que los resultados eran comparables. El ensayo de inmunotransferencia tiene la ventaja de ser más simple de llevar a cabo que el de las sondas de ADN. Las placas con mitomicina duran más cuando se almacenan en la oscuridad a 4°C.

La inmunotransferencia de colonias o el uso de sondas son técnicas de trabajo intenso y se pueden aplicar mejor a muestras analizadas que hayan resultado positivas a la presencia de VT o genes de VT mediante, por ejemplo, el enzimoimmunoensayo (ELISA) o la PCR.

1.4. Identificación y caracterización de colonias sospechosas

Se debe confirmar bioquímicamente o genotípicamente (p. ej. por *GadA* PCR) que las colonias que crecen sobre medios sólidos, sospechosas de VTEC, son de *E.coli*. Los antígenos "O" somáticos y los "H" flagelares se identifican serológicamente. Se cree que no todas las VTEC aisladas de animales son patógenas para los humanos. Algunos aislamientos de *E. coli* O157, en concreto los procedentes de cerdos, no son verocitotoxigénicos ni patógenos para los humanos. El diagnóstico, por tanto, debe

incluir la demostración de los factores de virulencia conocidos en los aislamientos. Estos incluyen las verocitotoxinas VT1 (Stx1) y VT2 (Stx2) y sus genes, además de la intimina, que es la proteína anclada en la membrana exterior, relacionada con la aparición y supresión de lesiones, y codificada por el gen *eae* (Law, 2000). Para las cepas de VTEC 0157, se dispone de métodos de subtipificación en laboratorios de referencia para investigaciones epidemiológicas.

1.4.1. Pruebas bioquímicas

Las VTEC son bioquímicamente similares a otras *E. coli*. Las cepas de VTEC 0157:H2 difieren en que no fermentan el sorbitol, no producen beta-glucuronidasa y fermentan la rafinosa y el dulcitol. Se puede distinguir *Escherichia coli* de *E. hermanii* por la falta de crecimiento en presencia de cianuro potásico e incapacidad para fermentar la celobiosa. *Escherichia hermanii* es positiva en ambas pruebas. El noventa y ocho por ciento de las cepas de *E. hermanii* tiene un pigmento amarillo característico sobre agar nutritivo que no se ve en la VTEC. *Escherichia coli* se puede confirmar mediante la utilización de triptófano y actividad con la beta-galactosidasa (ver más adelante) o mediante tiras de pruebas bioquímicas disponibles comercialmente.

1.4.2. Pruebas serológicas

Hay disponibles kits comerciales de látex para 0157, 026, 091, 0103, 0111, 0128, 0145 y H7. Los ensayos han de llevarse a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se deben incorporar microorganismos control positivos y negativos y control del látex. Se debe llevar a cabo un análisis preliminar utilizando pruebas de aglutinación en porta o tubo con antisuero anti-O LPS (existen antisueros disponibles para 181 antígenos-O). Se ha demostrado que el antisuero 0157 produce reacciones cruzadas con otros microorganismos incluyendo *E. hermanii* (encontrado frecuentemente en alimentos), *Salmonella* O del grupo N, *Yersinia enterocolitica* serotipo 09 y *Citrobacter freundii*, lo que indica la necesidad de confirmar las colonias sospechosas de VTEC como *E. coli*. Los aislamientos deben probarse para detectar la presencia de antígeno flagelar (los antisueros se preparan contra antígenos-H 56), pero esto puede requerir un pase a través de un medio para detectar la movilidad. Algunos patógenos no son móviles.

1.4.3. Producción de verocitotoxina en ensayos de células Vero (Johnson *et al.*, 1996a)

El ensayo de células Vero permanece como un método normalizado para la confirmación de la producción de VT (ver más adelante). Las células Vero poseen una alta concentración de globotriaosilceramida (Gb₃) y globotetraosilceramida (Gb₄) como receptores de la unión de la toxina en su membrana plasmática y normalmente detectan todas las variantes de VT. La prueba se puede utilizar con suspensiones fecales, filtrados de cultivo o cultivos vivos. En cultivos fecales mezclados, la sensibilidad del ensayo aumenta tratando la suspensión con polimixina B o mitomicina para liberar toxina asociada a la célula. Aunque esta prueba es sensible, no está sin embargo disponible en la mayoría de los laboratorios de diagnóstico rutinario. Requiere un trabajo intenso y los resultados pueden llevar 3–4 días después de inocular el cultivo celular. Donde no haya instalaciones para cultivo de tejidos, para detectar la producción de VT, se pueden utilizar otros métodos, incluyendo ELISA o aglutinación, y por PCR se pueden detectar los genes *vt*. Todos estos métodos están disponibles como kits comerciales.

1.4.4. Subtipificación de *Escherichia coli* 0157 para estudios epidemiológicos

Se dispone de una variedad de métodos en laboratorios de referencia que permiten discriminar entre cepas de *E. coli* 0157:H7 para ayudar en las investigaciones epidemiológicas de brotes de la enfermedad humana (Hopkins & Hilton, 2000; Strockbine *et al.*, 1998). Estos métodos varían en su complejidad técnica y se requiere más de una técnica para proporcionar una diferenciación útil. Las técnicas incluyen tipificación por fagos, pruebas de biotipificación y sensibilidad antimicrobiana (no siendo común la resistencia en cepas procedentes de la mayoría de los países), perfil de plásmidos, análisis del polimorfismo de la longitud de fragmentos de restricción, ribotipificación, electroforesis en gel de campo pulsante (EGCP) y varios análisis basados en la PCR (amplificación aleatoria del ADN polimórfico; PCR del elemento de ADN repetitivo; análisis del polimorfismo de la longitud del plásmido amplificado). De estos, solamente la tipificación del fago y la EGCP se usan ampliamente. A pesar de las dificultades en la interpretación de los perfiles, la EGCP se ha impuesto como el método estándar utilizado por laboratorios de referencia de salud pública para subtipificar la VTEC 0157 debido a su alto nivel de discriminación, precisión y reproducibilidad. Se utiliza en "Pulsenet", una red de laboratorios de salud pública que utilizan un método de EGCP estandarizado que permite la comparación de huellas dactilares por una base de datos electrónicos en los Centros de Control de Enfermedad y Prevención en los EE.UU.

(www.cdc.gov/ncidod/dbmd/pulsenet/pulsenet.htm). El sistema "Enter-net" de la Unión Europea para el seguimiento de *Salmonella* y la VTEC descansa fundamentalmente en la tipificación fágica para subtipificar las cepas de *E. coli* 0157:H7. Se ha demostrado que la utilización de la subtipificación de genes para la intimina y la VT es valiosa para los estudios epidemiológicos y la atribución de la fuente (Beutin *et al.*, 2004; 2007). Los métodos de subtipificación para serotipos no-157 han sido menos explorados, aunque se pueden adoptar procedimientos moleculares similares a los utilizados para la VTEC 0157.

1.5. Técnicas sin cultivo para la detección de la VTEC

Aunque el diagnóstico definitivo de la VTEC depende del aislamiento y caracterización de cultivos puros, los métodos de cultivo para la VTEC son laboriosos y llevan mucho tiempo. Esto ha llevado al desarrollo de una serie de pruebas inmunológicas y de hibridación de ácido nucleico para la identificación rápida de antígenos de O y H, y de VT o genes asociados con la producción de VT en la muestra. Ya que las pruebas tienen un nivel de detección por encima de las cantidades a las que el organismo está presente normalmente en las heces, se necesita una fase de enriquecimiento (preferiblemente no selectivo para el aislamiento de bacterias dañadas o con alteraciones) para aumentar las cantidades antes de la prueba.

1.5.1. Métodos inmunológicos

Se pueden utilizar inmunoensayos para identificar antígenos O y H, y se puede utilizar VT para confirmar la identidad de los microorganismos una vez que se han aislado de muestras clínicas, alimenticias o ambientales, mientras que otros como las tecnologías de membranas y varillas, ensayos de microplaca, inmunotransferencia de colonias, inmunofluorescencia y ELISA, se utilizan como métodos rápidos para detectar la presencia de patógenos potenciales en las muestras antes de su aislamiento, acortando, por tanto, el tiempo para un supuesto diagnóstico. La mayor parte de los ensayos para antígenos somáticos y flagelares se diseñan para detectar LPS 0157 y el antígeno flagelar H7. Los ensayos con toxinas tienen la ventaja de detectar todas las VTEC. Existen kits comerciales para enzimoimmunoensayos con 0157 y VT, inmunoensayo visual para 0157 y pruebas de aglutinación para 0157, H7 y VT (7, 11, 27, 33). No todas se han validado para utilización en heces. También hay reactivos especializados disponibles en los que anticuerpos anti-0157 se conjugan con fluoresceína, peroxidasa o fosfatasa. De los enzimoimmunoensayos el formato que se usa con más frecuencia es el ensayo en "sandwich". El anticuerpo está ligado a la superficie de un portador para capturar un antígeno específico de VTEC; después de la adición del sustrato apropiado, un segundo anticuerpo con un marcador enzimático se liga a este antígeno y produce una reacción de color. Los kits se han validado con protocolos de preenriquecimiento específicos y reactivos para asegurar resultados reproducibles. Algunos utilizan muestras tratadas con calor mejorando de esa forma la seguridad de la prueba, y otros incorporan un sistema de procesamiento automático para analizar grandes cantidades de muestras. Otros son ELISAs desarrollados para analizar colonias con el antígeno 0157. Los kits comerciales tienen la ventaja de que son fáciles de llevar a cabo en laboratorios rutinarios, y las pruebas deben hacerse de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los kits validados para muestras de alimentos y de canales o para muestras clínicas humanas pueden carecer de sensibilidad para muestras de heces de animales. Los ensayos inmunológicos solo proporcionan resultados preliminares, que pueden confirmarse por aislamiento y caracterización de los microorganismos que producen el antígeno 0157 o la toxina. Está variando la disponibilidad de kits, y los laboratorios de referencia de la OIE deberían ser capaces de proporcionar la información más reciente sobre kits de diagnóstico.

1.5.2. Métodos de reconocimiento con ácido nucleico

i) *Ensayos de hibridación en colonia*

La hibridación en colonia es un medio útil para detectar la VTEC en cultivo mixto para una caracterización posterior. Están disponibles sondas de ADN y de oligonucleótido sintético marcadas con digoxigenina o biotina y por tanto adecuadas para utilización en laboratorios de diagnóstico. Se han descrito ensayos para detectar genes de VT, el plásmido de 60 MDa en *E. coli* 0157 y el gen *eae*, individualmente y en combinación (Nataro & Kaper, 1998; Paton & Paton, 1998; Strockbine *et al.*, 1998). Los ensayos de hibridación son menos sensibles para detectar la VTEC en cultivos líquidos o extractos fecales.

ii) *PCR para genes de VT y otros marcadores de virulencia*

Se han descrito muchos PCR para la detección de *VT1*, *VT2* y genes variantes de *VT2* (Nataro & Kaper, 1998; Paton & Paton, 1998; Strockbine *et al.*, 1998), y se han comparado algunos de estos métodos de PCR tipificadores de la toxina (Ziebell *et al.*, 2002). La presencia de los genes asociados con la producción de VT no confirma la expresión del gen y por tanto la producción de toxina. La PCR puede utilizarse sobre placas con cultivo puro o mixto, o en cultivos líquidos, y extractos de alimentos o heces. También puede utilizarse para detectar genes en microorganismos inviables. La PCR, además del papel que desempeña en el diagnóstico, tiene el potencial de ser utilizada para analizar muestras para la VTEC en estudios epidemiológicos. La amplificación de genes diana en extractos de ADN bacteriano de heces es menos efectiva que en cultivos puros, y se requiere una preparación cuidadosa de la muestra para mejorar su sensibilidad. Las heces contienen inhibidores inespecíficos de la PCR y no existe ningún método único ideal para eliminarlos. La sensibilidad mejora mediante el enriquecimiento no selectivo previo a la prueba, pero permanece menor que mediante la utilización de IMS o el ensayo de citotoxicidad de células Vero. Existen ensayos disponibles comercialmente.

También se han desarrollado sondas de ADN, ensayos de PCR y ensayos de hibridación con "microarrays" para detectar otros genes en VTEC que, según se ha demostrado, están asociados con la virulencia en humanos, incluyendo *eae* (que codifica intimina), *ehx* (que codifica la producción de enterohemolisina), *fliC* (que codifica el antígeno H7), *rfb* 0157 (que codifica LPS 0157), *uidA* (el gen de la glucuronidasa mutante en *E. coli* 0157:H7 negativo a la beta-glucuronidasa) y *katP* (un gen situado sobre un gran plásmido de *E. coli* 0157:H7 que codifica una nueva catalasa peroxidasa) (Bekal *et al.*, 2003; Nataro & Kaper, 1998; Paton & Paton, 1998; Strockbine *et al.*, 1998). Se ha desarrollado varios ensayos múltiples para detectar simultáneamente diversos genes de diagnóstico. Estos ensayos son importantes en la caracterización de cultivos puros. En poblaciones bacterianas mixtas de muestras de alimentos o heces pueden ser útiles en la identificación de muestras para las que se deben diseñar procedimientos de aislamiento.

1.6. Análisis de heces para la detección de *Escherichia coli* 0157:H7

Escherichia coli 0157:H7 es la VTEC más preocupante para la salud pública en la mayoría de los países. El hecho de que se aloje en el tracto intestinal de animales sanos, particularmente del ganado vacuno, representa una fuente de infección directa e indirecta para los humanos. El análisis se basa en las técnicas de cultivo diseñadas para superar los problemas del aislamiento de un número reducido de microorganismos, posiblemente en estado alterado, de una flora competidora de fondo mediante la identificación de colonias sospechosas y la demostración de las características de virulencia conocidas. Estos métodos aún están en desarrollo y el siguiente es una descripción de los métodos empleados rutinariamente en un laboratorio veterinario nacional. Se deben tomar las precauciones adecuadas para evitar la contaminación de humanos (véase el capítulo 1.1.4).

1.6.1. Pre-enriquecimiento

- i) Se transportan las heces en contenedores estériles, herméticos y cerrados a 4°C y se ponen en cultivo lo antes posible, preferiblemente dentro de las 2 horas siguientes a la recogida. Las heces que se hayan de almacenar durante un largo periodo deben congelarse a -70°C.
- ii) Se mezclan las heces a una dilución de 1/10 en agua caliente tamponada con peptona (BPW) en un contenedor etiquetado.
- iii) Se incuban a 37°C ±2°C durante 6 horas.
- iv) Se incluyen cultivos como control positivos y negativos.

1.6.2. Separación inmunomagnética

- i) El uso de Dynabeads® anti-*E.coli* 0157, producto 710.04 (DynaL Biotech, ASA, Oslo, Noruega), cumple los requisitos de AFNOR (DYN 16/02-0696 y DIN 10167); se cita en el Manual Analítico Bacteriológico de la Administración de Alimentos y Drogas de EE.UU. (www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-4a.html) y el Compendio de Métodos Analíticos de la Salud de Canadá (www.hc-sc.gc.ca/food-aliment/mh-dm/mge-dme/compendium/volume_3/e_mflp9001.html) y es el método oficial del Ministerio de Salud de Japón.

- ii) Siguiendo las instrucciones de los fabricantes, se lleva a cabo la separación inmunomagnética (IMS) sobre las muestras preenriquecidas utilizando el método manual (MIMS) o automático (AIMS). Se ha de tener cuidado en mezclar bien las bolas antes de utilizarlas, y evitar la contaminación cruzada entre los tubos preparados. Si se utiliza el método manual, es esencial ceñirse a las instrucciones para lavar con cuidado el complejo bola-bacteria.
- iii) Después del lavado final, se usa una micropipeta para pasar 50 µl de cada suspensión de bolas-bacterias a una placa de agar MacConkey etiquetada con sorbitol que contenga cefixima y telurito potásico (CT-SMAC) (Zadik *et al.*, 1993) teniendo cuidado de evitar la contaminación cruzada.
- iv) Utilizando una torunda estéril, se extiende la gota sobre un tercio o la mitad de la placa para romper los complejos. Utilizando un asa estéril de 1 µl, se diluye más el complejo bola-bacteria sobre un cuadrante extendiendo en ángulo recto desde el área previamente sin extender. Utilizando una segunda asa estéril, se extiende en ángulo recto desde este cuadrante hasta el área final de la placa sin extender para obtener colonias aisladas. Se incuba a 37°C ± 2°C durante 16–18 horas (las colonias que fermentan sorbitol pierden color tras este tiempo y pueden confundirse con *E. coli* 0157 que no fermenta sorbitol). Un método alternativo para aislar colonias negativas a sorbitol es extender el inóculo completo sobre la superficie de una placa de CT-SMAC seca con una varilla doblada estéril.

1.6.3. Identificación de colonias

- i) Se pican hasta 10 colonias blancas negativas a sorbitol por placa y se prueban mediante la aglutinación de látex 0157 siguiendo las instrucciones del fabricante (incluir los microorganismos de control positivos y negativos y el control de látex adecuados)
- ii) Se subcultivan las colonias positivas para aglutinación sobre un medio sólido sin antibióticos (por ejemplo 5% agar sangre de oveja). Se extiende para obtener colonias aisladas. Se incuba a 37°C ± 2°C durante la noche.

1.6.4. Confirmación de *Escherichia coli*

- i) Se inocula caldo de o-nitrofenil beta-D-galactopiranosido (ONPG). Se establecen controles positivos y negativos. Se incuba durante la noche, aeróbicamente a 37°C. *Escherichia coli* produce un resultado positivo indicado por un cambio a la coloración amarilla, lo que confirma la actividad de la beta-galactosidasa.
- ii) Se coloca un círculo de papel de filtro de membrana de nitrato de celulosa de 0,45 µm sobre una placa de agar con bilis y triptona, (TBA) utilizando fórceps estériles. Se utiliza un asa de 1 µl para retirar un asa completa de crecimiento para la prueba y se inocula un área del tamaño de un guisante sobre la superficie del filtro Millipore. Se establecen controles positivos y negativos. Se incuba a 44°C durante al menos 17 horas. Se transfiere la membrana a un papel de filtro empapado con reactivo para indol a fin de detectar la utilización de triptófano. *Escherichia coli* muestra una reacción positiva indicada por una coloración violeta-rosa.
- iii) Existe en el mercado un colorante para la detección de indol. Se coloca el reactivo sobre papel de filtro y se extiende una porción de la colonia sobre la mancha del reactivo. Esto requiere menos de 5 minutos y puede confirmarse mediante la prueba descrita si las colonias sospechosas aparecen negativas. También está disponible en el mercado el medio con indol.
- iv) Alternativamente, se utilizan tiras comerciales de pruebas bioquímicas disponibles para confirmar la presencia de *E. coli*.

1.6.5. Determinación somática (Matthews *et al.*, 2006)

- i) Utilizando un asa estéril, se toma una sola colonia obtenida mediante el método de la identificación de las colonias descrito en el punto (c) anterior y se subcultiva en 4 ml de caldo Schlecht (Ring & Schlecht, 1970). Se incuba a 37°C ± 2°C durante la noche.
- ii) Se hierve el caldo Schlecht durante un mínimo de 1 hora a 100°C.
- iii) Se ponen 25 µl de solución salina al 0,85% en los pocillos 2 al 12 de una placa de microtitulación con pocillos en U. Se ponen 50 µl de antisuero 0157 en el pocillo 1. Se hacen una serie de diluciones dobles del antisuero hasta 1/1024, descartando 25 µl después de mezclar bien. Se añaden 50 µl de suspensión de caldo hervido a los pocillos

1 al 12. Se cubre la placa para impedir la evaporación y se incuba a 37°C durante 6 horas. Se utiliza un fondo negro para identificar la aglutinación en los pocillos.

1.6.6. Ensayo en células Vero

- i) Utilizando un asa estéril, se toma una colonia aislada obtenida mediante el método de identificación de colonias descrito en el punto (c) anterior y se subcultiva en 4 ml de caldo Mundell (1976). Se incuba a 37°C ± 2°C durante la noche.
- ii) Se hacen caldos con las cepas control de microorganismos que no produzcan ninguna toxina, que produzcan enterotoxina termolabil (LT), factor necrotizante citotóxico (CNF) y verocitotoxina (VT). Se incuba a 37°C ± 2°C durante la noche.
- iii) Se colocan las células Vero (células de riñón de mono verde Africano, referencia ATCC CCL81, proporción de siembra 2 x 10⁵/ml) en placas de microprueba con pocillos de fondo liso, 200 µl para cada pocillo, 24 horas antes de la inoculación. Se incuba a 37°C ± 2°C en 5% de CO₂ durante 24 horas.
- iv) Se añaden 100 µl de una disolución de 400.000 unidades/ml de sulfato de polimixina B en agua destilada estéril a cada cultivo líquido durante la noche. Se incuba a 37°C ± 2°C durante 5 horas.
- v) Se centrifugan los caldos a 3.000 rpm durante 30 minutos.
- vi) Se retiran los sobrenadantes en contenedores estériles etiquetados (se necesitan 1,5 ml aproximadamente).
- vii) Se coloca la placa de células Vero sobre una hoja de trabajo numerada para identificar cada pocillo. Se inoculan 10 µl de sobrenadante preparado en el pocillo relevante de las células Vero. Se vuelve a poner las células Vero en el incubador de CO₂ y se incuban durante 3 días.
- viii) Se examinan las células después de 24, 48 y 72 horas para observar cualquier efecto citopático. Se comparan con las pruebas control positivas y negativas. Con muestras positivas a VT, la capa celular se desintegra y entre las 24 y 72 horas puede verse que están ennegrecidas y arrugadas.

1.6.7. PCR multiplex para VT1, VT2 y *eae* (Beebakhee *et al.*, 1992; Jackson *et al.*, 1987; Strockbine *et al.*, 1988)

Se utiliza la PCR multiplex para confirmar la presencia de determinantes de virulencia utilizando cebadores, como se muestra a continuación:

Gen objetivo	No. de acceso	Secuencia del cebador	Posición del nucleótido	Tamaño del amplicón (pb)
VT1	M19437	F (5'-CGC-TCT-GCA-ATA-GGT-ACT-CC-3')	287-306	256
		R (5'-CGC-TGT-TGT-ACC-TGG-AAA-GG-3')	522-541	
VT2	X07865	F (5'-TCC-ATG-ACA-ACG-GAC-AGC-AG-3')	623-642	185
		R (5'-GC-TTC-TGC-TGT-GAC-AGT-GAC-3')	788-807	
<i>EaeA</i>	X60439	F (5'-GC-TTA-GTG-CTG-GTT-TAG-GAT-TG-3')	271-293	618
		R (5'-CCA-GTG-AAC-TAC-CGT-CAA-AG-3')	871-890	

- i) Utilizando un asa estéril, se coge una colonia aislada obtenida mediante el método de identificación de colonias descrito en el punto (c) anterior y se subcultiva en 1 ml de caldo Luria-Bertani. Se establecen tres caldos de control adecuados. Se incuba a 37°C ± 2°C durante la noche.
- ii) Se hierven los caldos durante 15 minutos a 100°C. Se retiran del baño de agua y se deja que se enfríen.
- iii) Se prepara una mezcla maestra de 48 µl por muestra que contenga:
1 x tampón Saiki (50 mM KCl; 10 mM Tris, pH 8,5; 100 µg/ml de gelatina); 3 mM de MgCl₂; 0,5 U de polimerasa Taq; 25 pmoles de cada cebador (cebadores directos e inversos para VT1, VT2 y *eaeA*); 0,2 mM de dATP, dCTP, dGTP y dTTP.

- iv) Se mezcla mediante inversión de los tubos y se ponen 48 µl en cada tubo de reacción de la PCR.
- v) Se añaden 2 µl de cultivo hervido (extracto crudo de ADN) al fondo de cada tubo de reacción (incluir tres extractos control y un medio blanco).
- vi) Se realiza una PCR utilizando parámetros cíclicos de desnaturalización inicial a 94°C durante 2 minutos; 25 ciclos de 94°C durante 1 minuto, 62°C durante 1,5 minutos y 72°C durante 2 minutos; con una extensión final a 72°C durante 5 minutos. La reacción se mantiene a 4°C hasta que se necesite para la electroforesis.
- vii) Se realiza una electroforesis con 15 µl de cada muestra de PCR sobre un gel de agarosa al 1,5% en tampón E (10x solución concentrada que se obtiene añadiendo a agua destilada en el siguiente orden: 109 g/litro de Tris, 55,6 g/litro de ácido ortobórico, 9,3 g de EDTA, completada hasta 1 litro con agua destilada y ajustada a pH 8,0 con 10 ml de ácido clorhídrico concentrado, diluida en agua destilada antes de usarla). Tomar como referencia un marcador de peso molecular de 10 pb para la comparación.
- viii) Se tiñe con bromuro de etidio y se observa mediante transiluminación
- ix) Se inspeccionan los recorridos del control para identificar las posiciones de los amplicones de VT1, VT2 y eae. Se comparan con las bandas presentes en los recorridos de las muestras-problema. Se registran los resultados.

2. Pruebas serológicas

En los humanos, el serodiagnóstico de la VTEC puede ser útil, particularmente en fase tardía del curso de la enfermedad cuando se hace cada vez más difícil aislar de las heces el microorganismo causante. El LPS ha resultado ser el antígeno preferido, y se ha demostrado la producción de anticuerpos de suero contra el LPS de un amplio espectro de serotipos prevalentes de la VTEC. Las pruebas serológicas no se utilizan para el diagnóstico de la infección animal con VTEC. Sin embargo, se ha demostrado que la exposición del ganado a la infección por *E. coli* O157:H7 da como resultado la producción de anticuerpos contra el LPS O157, que persiste durante meses, demostrables por ELISA indirecto (Johnson *et al.*, 1996b). Se han demostrado reacciones cruzadas entre LPS O157 y los antígenos de LPS de otras bacterias incluyendo *E. coli* O55, *Salmonella spp.*, *Yersinia enterocolitica*, *Brucella abortus* y cepas no-01 de *V. cholerae*. Para reducir la reactividad cruzada, se ha desarrollado un ELISA de bloqueo utilizando un anticuerpo monoclonal específico para *E. coli* O157 con anticuerpo competidor para la detección de anticuerpos de suero frente al antígeno O157 en ganado vacuno (Laegreid *et al.*, 1998). Se han demostrado anticuerpos de suero frente a VT1, pero no a VT2, en ganado mediante pruebas de neutralización de la toxina en ensayos con células Vero (Johnson *et al.*, 1996b). Otros estudios han mostrado una mayor prevalencia de anticuerpos neutralizantes de VT1 que de VT2, en sueros de ganado, lo que se puede explicar por la mayor prevalencia de la VTEC productor de VT1 en ganado y/o la menor inmunogenicidad de VT2.

C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS Y EL MATERIAL DE DIAGNÓSTICO

No existen en la actualidad vacunas disponibles para el control zoonótico de la VTEC. Se están explorando varios procedimientos para el control inmunológico de infecciones de EHEC en humanos (Levine, 1998). Estos están dirigidos a impedir la colonización, la enfermedad intestinal o las secuelas graves del síndrome de uremia hemolítica y púrpura trombocitopénica trombótica. Incluyen el uso de vacunas conjugadas (por ejemplo el polisacárido O157 ligado a la subunidad B de VT1 y VT2 como proteínas portadoras), vacunas de vector vivo, vacuna por toxoide o inmunización pasiva con globulina hiperinmune o anticuerpos monoclonales contra VT. Sin embargo, si existiera una vacuna efectiva disponible, serían polémicas las consecuencias políticas, sociales y económicas de una vacunación extensiva de las personas contra patógenos existentes en sus alimentos. Como se cree que los animales, fundamentalmente el ganado vacuno, son reservorios de la infección de la población humana, una estrategia nueva que se está investigando es vacunar al ganado vacuno para reducir la colonización con VTEC patógena y reducir, por tanto, la contaminación de los alimentos y del ambiente (por ejemplo, hacer que los alimentos sean más seguros como medida opuesta a proteger al consumidor). Una posibilidad es usar una cepa viva colonizante negativa a la toxina como vacuna oral para inducir anticuerpos contra los componentes de superficie, y otra es proporcionar factores de colonización, como la intimina, como vacuna por vía digestiva a través de plantas transgénicas (Gyles, 1998).

REFERENCIAS

BEEBAKHEE G., LOUIE M., DE AZAVEDO J. & BRUNTON J. (1992). Cloning and nucleotide sequence of the *eae* gene homologue from enterohemorrhagic *Escherichia coli* serotype O157:H7. *FEMS Microbiol. Lett.*, **91**, 63–68.

- BEKAL S., BROUSSEAU R., MASSON L., PREFONTAINE G., FAIRBROTHER J. & HAREL J. (2003). Rapid identification of *Escherichia coli* pathotypes by virulence gene detection with DNA microarrays. *J. Clin. Microbiol.*, **40**, 2113–2125.
- BETTELHEIM K.A. (2000). Role of non-O157 VTEC. *J. Appl. Microbiol.*, **88**, 38S–50S.
- BEUTIN L., GEIER D., STEINRUCK H., ZIMMERMANN S. & SCHEUTZ F. (1993). Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-like toxin)-producing *Escherichia coli* in seven species of healthy domestic animals. *J. Clin. Microbiol.*, **31**, 2483–2488.
- BEUTIN L., KRAUSE G., ZIMMERMANN S., KAULFUSS S. & GLEIER K. (2004). Characterization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from human patients in Germany over a 3-year period. *J. Clin. Microbiol.*, **42**, 1099–1108.
- BEUTIN L., MIKO A., KRAUSE G., PRIES K., HABY S., STEEGE K. & ALBRECHT N. (2007). Identification of human-pathogenic strains of shiga toxin-producing *Escherichia coli* from food by a combination of serotyping and molecular typing of shiga toxin genes. *Appl. Env. Microbiol.*, **73**, 4769–4775.
- DE BOER E. & HEUVELINK A.E. (2001). Evaluation of methods for the detection and isolation of *Escherichia coli* O157 from foods and faeces. Proceedings of European Union Concerted Action CT98-3935. Verocytotoxigenic *E. coli* in Europe. 1. Methods for Verocytotoxigenic *E. coli*, Duffy G., Garvey P., Coia J., Wasteson Y. & McDowell D.A., eds. *Int. J. Food Microbiol.*, **66**, 25–35.
- BLACKBURN C.W. & MCCARTHY J.D. (2000). Modifications to methods for the enumeration and detection of injured *Escherichia coli* O157:H7 in foods. *Int. J. Food Microbiol.*, **55**, 285–290.
- CHAPMAN P.A. & CUDJOE K.S. (2001). Evaluation of Beadretreiver™, an automated system for concentration of *Escherichia coli* O157 from enrichment cultures by immunomagnetic separation. *J. Rapid Methods Automation Microbiol.*, **9**, 203–214.
- CHAPMAN P.A., WRIGHT D.J. & SIDONS C.A. (1994). A comparison of immunomagnetic separation and direct culture for the isolation of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 from bovine faeces. *J. Med. Microbiol.*, **40**, 424–427.
- CLIFTON-HADLEY F.A. (2000). Detection and diagnosis of *Escherichia coli* O157 and other verocytotoxigenic *E. coli* in animal faeces. *Rev. Med. Microbiol.*, **11**, 47–58.
- DE BOER E. & HEUVELINK A.E. (2001). Evaluation of methods for the detection and isolation of *Escherichia coli* O157 from foods and faeces. Proceedings of European Union Concerted Action CT98-3935. Verocytotoxigenic *E. coli* in Europe. 1. Methods for Verocytotoxigenic *E. coli*, Duffy G., Garvey P., Coia J., Wasteson Y. & McDowell D.A., eds. *Int. J. Food Microbiol.*, **66**, 25–35.
- GYLES C.L. (1998). Vaccines and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in animals. In: *Escherichia coli* O157:H7 and Other Shiga Toxin-Producing *E. coli* Strains, Kaper J.B. & O'Brien A.D. eds. ASM Press, Washington, D.C., USA, 434–444.
- HOPKINS K.L. & HILTON A.C. (2000). Methods available for the sub-typing of *Escherichia coli* O157. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **16**, 741–748.
- HULL A.E., ACHESON D.W.K., ECHEVERRIA P., DONOHUE-ROLFE A. & KEUSCH G.T. (1993). Mitomycin immunoblot colony assay for detection of shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* in fecal samples: comparison with DNA probes. *J. Clin. Microbiol.*, **31**, 1167–1172.
- JACKSON M.P., NEILL R.J., O'BRIEN A.D., HOLMES R.K. & NEWLAND J.W. (1987). Nucleotide sequence analysis and comparison of the structural genes for Shiga-like toxin I and Shiga-like toxin II encoded by bacteriophages from *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **44**, 109–114.
- JOHNSON R.P., CLARKE R.C., WILSON J.B., READ S.C., RAHN K., RENWICK S.A., SANDHU K.A., ALVES D., KARMALI M.A., LIOR H., MCEWEN S.A., SPIKA J.S. & GYLES C.L. (1996a). Growing concerns and recent outbreaks involving non-O157:H7 serotypes of verocytotoxigenic *Escherichia coli*. *J. Food Protect.*, **59**, 1112–1122.
- JOHNSON R.P., CRAY W.C. & JOHNSON S.T. (1996b). Serum antibody responses of cattle following experimental infection with *Escherichia coli* O157:H7. *Infect. Immun.*, **64**, 1879–1883.

- KARCH H. & BIELASZEWSKA M. (2001). Sorbitol-fermenting Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H- strains: Epidemiology, phenotypic and molecular characteristics and microbiological diagnosis. *J. Clin. Microbiol.*, **39**, 2043–2049.
- KONOWALCHUK J., SPEIRS J.I. & STAVRIC S. (1977). Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, **18**, 775–779.
- LAEGREID W., HOFFMAN M., KEEN J., ELDER R. & KWANG J. (1998). Development of a blocking enzyme-linked immunosorbent assay for detection of serum antibodies to O157 antigen of *Escherichia coli*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **5**, 242–246.
- LAW D. (2000). Virulence factors of *Escherichia coli* O157 and other Shiga toxin-producing *E. coli*. *J. Appl. Microbiol.*, **88**, 729–745.
- LEE J.H. & CHOI S. (2006). Isolation and characteristics of sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157 strains from cattle. *Microbes and Infection*, **8**, 2021–2026.
- LEVINE M.M. (1998). Immunoprophylaxis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection and disease: strengths and weaknesses of various strategies. In: *Escherichia coli* O157:H7 and Other Shiga Toxin-Producing *E. coli* Strains, Kaper J.B. & O'Brien A.D., eds. ASM Press, Washington, D.C. USA, 405–408.
- MATTHEWS L., MCKENDRICK I.J., TERNENT H., GUNN G.J., SYNGE B. & WOOLHOUSE M.E.J. (2006). Super-shedding cattle and the transmission dynamics of *Escherichia coli* O157. *Epidem. Infect.*, **134**, 131–142.
- MEYER-BROSETA S., BASTIAN S.N., ARNE P.D., CERF O. & SANAA M. (2001). Review of epidemiological surveys on the prevalence of contamination of healthy cattle with *Escherichia coli* serogroup O157:H7. *Int. J. Hyg. Environ. Health*, **203**, 347–361.
- MUNDELL D.H., ANSELMO C.R. & WISHNOW R.M. (1976). Factors influencing heat-labile *Escherichia coli* enterotoxin activity. *Infect. Immun.*, **14**, 383–388.
- NATARO J.P. & KAPER J.B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.*, **11**, 142–201.
- O'BRIEN A.D. & LAVECK G.D. (1983) Purification and characterization of a *Shigella dysenteriae* type 1-like toxin produced by *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, **40**, 675–683.
- PATON J.C. & PATON A.W. (1998). Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clin. Microbiol. Rev.*, **11**, 450–479.
- RICE D.H., SHENG H.Q., WYNIA S.A. & HOVDE C.J. (2003). Rectoanal mucosal swab culture is more sensitive than fecal culture and distinguishes *Escherichia coli* O157:H7-colonized cattle and those transiently shedding the same organism. *J. Clin. Microbiol.*, **41**, 4924–4929.
- RING K. & SCHLECHT S. (1970). Ein neuer laboratoriumsfermenter zur züchtung von mikroorganismen im turbidostatischen, chemostatischen und "batch" verfahren. II. Mitteilung. Arbeitsweise und anwendungsbeispiele. *Zentralblatt für Bakteriologie Parasitenkunde*, **213**, 103–119.
- STROCKBINE N.A., JACKSON M.P., SUNG L.M., HOLMES R.K. & O'BRIEN A.D. (1988). Cloning and sequencing of the genes for Shiga toxin from *Shigella dysenteriae* type 1. *J. Bacteriol.*, **170**, 1116–1122.
- STROCKBINE N.A., WELLS J.G., BOPP C.A. & BARRETT T.J. (1998). Overview of detection and subtyping methods. In: *Escherichia coli* O157:H7 and Other Shiga Toxin-Producing *E. coli* Strains, Kaper J.B. & O'Brien A.D., eds. ASM Press, Washington, D.C., USA, 331–356.
- VERNOZY-ROZAND C. (1997). Detection of *Escherichia coli* O157:H7 and other verocytotoxin-producing *E. coli* (VTEC) in food. *J. Appl. Microbiol.*, **82**, 537–551.
- ZADIK P.M., CHAPMAN P.A. & SIDONS C.A. (1993). Use of tellurite for the selection of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157. *J. Med. Microbiol.*, **39**, 155–158.

ZIEBELL K.A., READ S.C., JOHNSON R.P. & GYLES C.L. (2002). Evaluation of PCR and PCR-RFLP protocols for identifying Shiga toxins. *Res. Microbiol.*, **153**, 289–300.

*
* *

NB: Existe un Laboratorio de Referencia de la OIE para *Escherichia coli*
(puede consultarse la página web de la OIE:

<https://www.oie.int/es/que-ofrecemos/red-de-expertos/laboratorios-de-referencia/#ui-id-3>).

Para más información sobre *Escherichia coli*, por favor contacte con el Laboratorio de Referencia de la OIE.

NB: ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 2004. ÚLTIMAS ACTUALIZACIONES ADOPTADAS EN 2008.