



Departamento de Microbiología  
Facultad de Biología

# "Detección del gen *stx2* en muestras ambientales y evaluación de su variabilidad"



Tesis Doctoral

**Cristina García Aljaro**









**Departamento de Microbiología  
Facultad de Biología**

***"Detección del gen  $stx_2$  en muestras ambientales y  
evaluación de su variabilidad"***

**Cristina García Aljaro  
Tesis Doctoral**

**Barcelona, Junio 2004**





**Departamento de Microbiología  
Facultad de Biología**

***"Detección del gen  $stx_2$  en muestras ambientales y  
evaluación de su variabilidad"***

Programa de Doctorado: Microbiología Ambiental y Biotecnología (1999-2001)

Conformidad del Director de tesis,

Memoria presentada por Cristina  
García Aljaro para optar al título de  
Doctor en Biología.

Dr. Anicet R. Blanch i Gisbert

Cristina García Aljaro

Barcelona, Junio 2004



***A mi familia***



## **Agradecimientos**

*... y llegó el momento de que muchos de vosotros veáis lo que he estado haciendo durante los últimos cinco años... (entre otras cosas)*

*Pues sí, aquí lo tenéis... Pero antes de que entréis de lleno en ello, me gustaría dedicar unas palabras de agradecimiento a los que, de alguna manera u otra, habéis contribuido a hacer que estos años de esfuerzo hayan transcurrido de una manera agradable.*

*En primer lugar, gracias a mi director de tesis, el Dr. Anicet Blanch, quien me abrió las puertas al mundo de la investigación. Gracias Anicet, por darme la oportunidad de formar parte de tu equipo de investigación, en el cual siempre me he sentido muy a gusto. Gracias por la paciencia que has tenido conmigo durante todos estos años, por mostrarme la ciencia en todos sus aspectos, no sólo los éxitos sino también sus limitaciones. Gracias por la confianza que siempre has depositado en mí.*

*Al Dr. Joan Jofre, por sus consejos y por sus valiosas aportaciones en el campo de la investigación. Por haber seguido tan de cerca el trabajo, por su dedicación y por los ánimos que siempre me ha dado para llevar a cabo este proyecto.*

*Al Dr. Francisco Lucena, por sus comentarios y reflexiones. A la Dra. Rosa Araujo y la Dra. Rosina Gironès, por atenderme siempre tan agradablemente.*

*Al Dr. Guillem Prats y al Dr. Jorge Blanco del Centro de Referencia de E. coli por sus aportaciones a este trabajo.*

*Y, siguiendo con mi grupo de investigación, a Xavi V., mi primer maestro en el laboratorio y a Yolanda, la experta en hibridaciones y PCRs. Gracias por los buenos momentos compartidos, las charlas y los consejos que me habéis dado a lo largo de estos años. A Marta C y Albert M, y cómo no, a los que los sustituyeron, Xavi B, siempre tan*

*alegre (gracias por acompañarme en los momentos más difíciles... sobre todo en el "Image Master") y Elisenda, la peque del grupo, muchos ánimos!!!! Gracias a todos porque no ha habido día en el que no me haya sentido contenta de formar parte de este equipo. Os echaré mucho de menos.*

*A los vecinos de enfrente, Michel, Ana C y Sandra, por alegrarme cada mañana y a Andrey, la última incorporación. Gracias por estar dispuesto a ayudar siempre (no me olvido de lo que le hiciste a la planta...). A los "ex-vecinos", Jordi D y Xavi M, el único que aún queda por aquí, un gran amigo y una gran persona. Siento las esperas interminables.*

*A "los del 13", Silvia y Pili, con quienes además he compartido algún que otro grupo de prácticas, Ayalke, Néstor y Carles. Gracias por alegrarme la hora de la comida. Y a los que ya no están en el departamento, Meritxell, Idoia, Juan Luis, Gonzalo y Sonia. Qué lástima no estar todos juntos!*

*A Maite, gracias por todo lo que me has ayudado a lo largo de la tesis. Gracias por transmitirme todas las técnicas que he ido necesitando en cada momento y tu experiencia en el laboratorio. A Laura, antigua compañera del laboratorio 38, gracias por tus consejos. A Ruth y a Carolina, que hace poco que empezaron en el departamento. A Ana Emilia y a Melanie, que ya se fueron.*

*A Núria Q, Núria C, Elisabet, Sara, gracias por la ayuda que me habéis prestado a lo largo de estos años.*

*A Rosario, por solucionar siempre todos los "problemillas" y por tu paciencia, a Cristina V y Susana C. Menudo trío!!! Gracias por tener siempre todo a punto. Que sepáis que me he habéis alegrado mucho la estancia en el departamento.*

*A Maria, Ceci, Maite P, Rocío, Silvia, Natalia, por los "Buenos días" de cada mañana.*

*A los del "Edificio Nuevo": Óscar, Marc, Quim, Marta, Núria P, Sonia... y muchos otros. Lástima que no hayamos compartido el mismo departamento!*

*A todos los profesores, en general, y a los secretarios, por hacer que el departamento siga funcionando.*

*Al Servicio de Microscopia de los Servicios Científico Técnico y al Servicio de Secuenciación del Parque Científico, por su asesoramiento.*

*A Bea, gran amiga de la Facultad, a la que la mayoría de vosotros conocéis. Gracias por escucharme y ayudarme siempre que lo he necesitado. (Perdona también las esperas!!!!)*

*A Mercè y a Marta, gracias por los ánimos que siempre me habéis dado. Espero que podamos conservar esta amistad durante muchos años. Y ánimo, que enseguida os toca a vosotras!!!! Mucha suerte!!!!*

*A Marta C y a Cristina G, que aunque cada vez nos veamos menos, empezamos juntas en esto.*

*A los del "Insti", Ana J, Pilar J...., parece que fue ayer que os empecé a hablar de mis bacterias.*

*A Marga, compañera de aventuras desde hace muchos años. Y aún me queda por escribir otro artículo...*

*A mi hermano, Ricardo, por haber estado siempre ahí, dispuesto a echarme una mano en lo que hiciera falta. Por todos los años que me has aguantado, por la paciencia que has tenido conmigo. Nada hubiera sido lo mismo sin ti.*

*Y cómo no, gracias a mis padres, porque habéis hecho posible que haya llegado hasta aquí. Gracias por estos 26 años de apoyo, de cariño, de comprensión. Gracias por*

*haber depositado en mi toda la confianza, por respetar mis decisiones, aunque no hayan sido siempre de vuestro agrado, por apostar por mí. Gracias a Vosotros, mis grandes maestros, los maestros de la vida, algo tan difícil de enseñar y tan importante a su vez. Gracias de verdad, por todos vuestros sacrificios, que espero poder compensar algún día.*

*Y por último, a la persona que ha tenido que soportarme día y noche durante este último año. Gracias Xavi, por tu cariño y por tu comprensión. Por los ánimos que siempre me has dado, por tus valiosas aportaciones, por tus "critiquillas"... (aunque en ciencia no se escriben frases de 10 líneas). Gracias por todos los momentos compartidos... y por los que vendrán.*

*"No existen suficientes experimentos que puedan demostrar que tengo razón, pero basta uno sólo para demostrar que estoy equivocado"*

*Albert Einstein*

*"La mayor sabiduría que existe es conocerse a uno mismo"*

*Galileo Galilei*



# ÍNDICE

<u>ABREVIATURAS</u>	1
<u>INTRODUCCIÓN GENERAL</u>	3
1. Emergencia de nuevos patógenos	5
2. Características generales de <i>Escherichia coli</i>	6
2.1. <i>E. coli</i> patógenas para el hombre	7
3. <i>Escherichia coli</i> productoras de toxina shiga (STEC)	9
3.1. Manifestaciones clínicas	9
3.2. Factores de virulencia	11
3.2.1. Las toxinas shiga	11
3.2.2. Intimina	13
3.2.3. Otros factores de virulencia	14
3.3. Emergencia de las cepas STEC	14
3.4. Mecanismos de transmisión	15
3.5. Epidemiología	18
4. Objetivos generales	21
<u>CAPÍTULO 1</u>	
<i>"Adaptación y evaluación de métodos y protocolos de aislamiento de cepas stec en muestras de origen ambiental y estudios de prevalencia de estas cepas"</i>	23
1.1- Introducción	25
1.1.1. Objetivos	28
1.2- Materiales y Métodos	31
1.2.1. Cepas bacterianas y medios de cultivo utilizados	31
1.2.2. Toma de muestras	31
1.2.3. Enumeración de indicadores bacterianos en las muestras analizadas	33
1.2.4. Enumeración de cepas portadoras del gen <i>stx<sub>2</sub></i>	33

1.2.4.1. Extracción de ADN bacteriano	34
1.2.4.2. Detección del gen <i>stx</i> <sub>2</sub> : amplificación de un fragmento del gen mediante la técnica de la PCR	35
1.2.4.3. Aumento de sensibilidad de la PCR: PCR anidada	36
1.2.4.4. Determinación de la sensibilidad de la PCR anidada	36
1.2.4.5. Estimación del número de bacterias portadoras del gen <i>stx</i> <sub>2</sub> en muestras de agua residual	37
1.2.4.6. Hibridación ADN-ADN mediante la técnica de "Dot Blot"	39
1.2.4.7. Secuenciación	39
<b>1.2.5. Desarrollo de una metodología para el aislamiento de cepas portadoras del gen <i>stx</i><sub>2</sub></b>	<b>40</b>
1.2.5.1. Hibridación colonial	40
1.2.5.2. Valoración de la especificidad de la sonda	42
1.2.5.3. Determinación del límite de detección del método	42
1.2.5.4. Aislamiento de cepas portadoras del gen <i>stx</i> <sub>2</sub> en muestras ambientales	43
1.2.5.5. Comprobación de las colonias hibridadas positivamente	43
<b>1.2.6. Enumeración y aislamiento de cepas de <i>E. coli</i> O157</b>	<b>44</b>
<b>1.3- Resultados</b>	<b>37</b>
<b>1.3.1. Enumeración de indicadores bacterianos en las muestras de agua residual y heces de bovinos</b>	<b>37</b>
<b>1.3.2. Cuantificación de cepas portadoras del gen <i>stx</i><sub>2</sub></b>	<b>49</b>
1.3.2.1. Detección del gen <i>stx</i> <sub>2</sub> : amplificación de un fragmento del gen mediante la técnica de la PCR simple	49
1.3.2.2. Análisis del límite de detección de la PCR atendiendo al método de extracción de ADN utilizado	50

1.3.2.3. Aumento de sensibilidad de la PCR: PCR anidada	50
1.3.2.4. Determinación del límite de detección de la PCR anidada	52
1.3.2.5. Estimación del número de bacterias portadoras del gen <i>stx</i> <sub>2</sub> en muestras de agua residual mediante PCR anidada	53
1.3.2.6. Variación estacional del número de bacterias portadoras del gen <i>stx</i> <sub>2</sub> en el agua residual urbana	56
1.3.2.7. Reducción de bacterias portadoras del gen <i>stx</i> <sub>2</sub> con relación a los indicadores de contaminación fecal analizados en el tratamiento del agua residual realizado en la EDAR 4 y 5	57
<b>1.3.3. Desarrollo de una metodología para el aislamiento de cepas portadoras del gen <i>stx</i><sub>2</sub> basada en la técnica de la hibridación colonial</b>	<b>59</b>
1.3.3.1. Valoración de la especificidad de la sonda	59
1.3.3.2. Determinación del límite de detección del método	61
1.3.3.3. Aislamiento de cepas <i>stx</i> <sub>2</sub> de las aguas residuales y heces de bovinos	62
<b>1.3.4. Enumeración y aislamiento de cepas de <i>E. coli</i> O157 en las aguas residuales</b>	<b>65</b>
1.3.4.1. Estimación del número de cepas O157	65
1.3.4.2. Aislamiento de cepas O157	67
<b>1.4 - Discusión</b>	<b>71</b>

## CAPÍTULO 2

<b>"Estudio de la diversidad de cepas bacterianas portadoras del gen <i>stx</i><sub>2</sub> y análisis de la variabilidad que presenta el gen"</b>	<b>79</b>
<b>2.1- Introducción</b>	<b>81</b>
<b>2.1.1. Sistemas de clasificación bacteriana</b>	<b>81</b>
2.1.1.1. Biotipado bioquímico	81

2.1.1.2. Serotipado	82
2.1.1.3. Genotipado	84
2.1.1.4. Fagotipado	84
<b>2.1.2. Características principales de las cepas STEC</b>	<b>84</b>
2.1.2.1. Factores de virulencia	84
2.1.2.1.1. Factores de virulencia codificados por bacteriófagos: las toxinas shiga	85
2.1.2.1.2. Factores de virulencia codificados por el cromosoma bacteriano: LEE e Intimina	87
2.1.2.1.3. Factores de virulencia plasmídicos: la enterohemolisina hemorrágica y otros	88
2.1.2.1.4. Otros factores de virulencia	89
2.1.2.2. Resistencia a los antibióticos	90
<b>2.1.3. Objetivos</b>	<b>90</b>
<b>2.2 - Materiales y Métodos</b>	<b>93</b>
<b>2.2.1. Cepas bacterianas y materiales de cultivo utilizados</b>	<b>93</b>
<b>2.2.2. Fenotipado bioquímico mediante el sistema PhenePlate®</b>	<b>95</b>
<b>2.2.3. Análisis del patrón del lipopolisacárido</b>	<b>97</b>
<b>2.2.4. Elección de cepas representativas del estudio</b>	<b>97</b>
<b>2.2.5. Clasificación de las cepas</b>	<b>98</b>
2.2.5.1. Identificación mediante la galería API 20E	98
2.2.5.2. Identificación mediante la secuenciación del gen codificante para el ARNr 16S	98
<b>2.2.6. Pruebas bioquímicas adicionales</b>	<b>99</b>
2.2.6.1. Fermentación del sorbitol	100
2.2.6.2. Detección de la actividad $\beta$ -D-glucuronidasa	100
<b>2.2.7. Serotipado</b>	<b>100</b>
<b>2.2.8. Análisis de la susceptibilidad bacteriana a diferentes antibióticos</b>	<b>101</b>

<b>2.2.9. Caracterización genética de las cepas representativas</b>	<b>101</b>
2.2.9.1. Extracción de ADN cromosómico	102
2.2.9.2. Localización del gen <i>stx<sub>2</sub></i>	102
2.2.9.3. Análisis de las variantes del gen <i>stx<sub>2</sub></i>	103
2.2.9.3.1. Detección de los genes <i>stx<sub>2i</sub></i> , <i>stx<sub>2α</sub></i> , <i>stx<sub>2d</sub></i> , <i>stx<sub>2e</sub></i> y <i>stx<sub>2f</sub></i> mediante PCR	103
2.2.9.3.2. Secuenciación de la subunidad A	103
2.2.9.4. Análisis de otros factores de virulencia	105
2.2.9.4.1. Detección del gen codificante para la toxina shiga 1, <i>stx<sub>1</sub></i>	105
2.2.9.4.2. Detección del gen codificante para la intimina, <i>eaeA</i>	105
2.2.9.4.3. Detección del gen codificante para la hemolisina enterohemorrágica, <i>ehxA</i>	105
2.2.9.4.4. Detección del gen codificante para la adhesina codificada por el gen <i>saa</i>	106
<b>2.2.10. Detección de la producción de la proteína Stx</b>	<b>106</b>
<b>2.3 - Resultados</b>	<b>107</b>
<b>2.3.1. Fenotipado bioquímico mediante el sistema PhenePlate®</b>	<b>107</b>
<b>2.3.2. Análisis del patrón del lipopolisacárido</b>	<b>109</b>
<b>2.3.3. Elección de cepas representativas</b>	<b>109</b>
<b>2.3.4. Clasificación de las cepas</b>	<b>111</b>
2.3.4.1. Identificación mediante la galería API 20E	111
2.3.4.2. Identificación mediante la secuenciación del gen codificante para el ARNr 16S	112
<b>2.3.5. Pruebas bioquímicas adicionales</b>	<b>112</b>
2.3.5.1. Fermentación del sorbitol	112
2.3.5.2. Detección de la actividad β-D-glucuronidasa	112
<b>2.3.6. Serotipado</b>	<b>113</b>
<b>2.3.7. Análisis de la sensibilidad a diferentes</b>	

antibióticos	115
<b>2.3.8. Caracterización genética de las cepas <i>stx</i><sub>2</sub> representativas</b>	<b>117</b>
2.3.8.1. Detección del gen <i>stx</i> <sub>2</sub> mediante PCR	117
2.3.8.2. Análisis de las variantes del gen <i>stx</i> <sub>2</sub>	117
2.3.8.2.1. Detección de los genes <i>stx</i> <sub>2i</sub> , <i>stx</i> <sub>2c</sub> , <i>stx</i> <sub>2d</sub> , <i>stx</i> <sub>2e</sub> y <i>stx</i> <sub>2f</sub> mediante PCR	117
2.3.8.2.2. Secuenciación de la subunidad A	118
2.3.8.2.3. Confirmación de la presencia de más de una copia del gen <i>stx</i> <sub>2</sub>	120
<b>2.3.8.3. Análisis de otros factores de virulencia</b>	<b>121</b>
2.3.8.3.1. Detección del gen codificante para la toxina shiga 1, <i>stx</i> <sub>1</sub>	121
2.3.8.3.2. Detección de producción de la proteína Stx <sub>1</sub> y Stx <sub>2</sub>	122
2.3.8.3.3. Detección del gen codificante para la intimina, <i>eaeA</i>	123
2.3.8.3.4. Detección del gen codificante para la hemolisina enterohemorrágica, <i>ehxA</i>	123
2.3.8.3.5. Detección del gen <i>saa</i>	123
<b>2.3.9. Seropatotipos</b>	<b>123</b>
<b>2.4- Discusión</b>	<b>127</b>

## *CAPÍTULO 3*

---

<b>"Diversidad de bacteriófagos portadores del gen <i>stx</i><sub>2</sub>"</b>	<b>135</b>
<b>3.1- Introducción</b>	<b>137</b>
<b>3.1.1. Objetivos</b>	<b>143</b>
<b>3.2- Materiales y Métodos</b>	<b>145</b>
<b>3.2.1. Cepas bacterianas y materiales de cultivo utilizados</b>	<b>145</b>
<b>3.2.2. Determinación de la presencia de bacteriófagos en las cepas STEC aisladas</b>	<b>146</b>

3.2.2.1. <i>Inducción del ciclo lítico de los bacteriófagos</i>	<b>146</b>
3.2.2.1.1. Comprobación del nivel de inducción de los bacteriófagos	<b>146</b>
3.2.2.2. <i>Purificación de los bacteriófagos</i>	<b>147</b>
3.2.2.3. <i>Extracción de ADN de los bacteriófagos purificados</i>	<b>147</b>
3.2.2.4. <i>Detección molecular del gen stx<sub>2</sub> en el ADN de los bacteriófagos mediante PCR</i>	<b>147</b>
3.2.2.5. <i>Detección de bacteriófagos codificantes para variantes del gen stx<sub>2</sub></i>	<b>148</b>
<b>3.2.3. Estudio de la diversidad genética de los bacteriófagos purificados</b>	<b>148</b>
3.2.3.1. <i>Análisis del patrón RFLP del ADN</i>	<b>148</b>
3.2.3.2. <i>Localización del gen stx<sub>2</sub></i>	<b>148</b>
<b>3.2.4. Estudio de la capacidad infectiva de los bacteriófagos purificados</b>	<b>150</b>
3.2.4.1. <i>Análisis del espectro de huéspedes</i>	<b>150</b>
3.2.4.1.1. Detección de bacteriófagos en las cepas huésped	<b>151</b>
3.2.4.1.2. Comprobación de la presencia de bacteriófagos stx <sub>2</sub> en las zonas de lisis observadas	<b>151</b>
<b>3.2.5. Obtención de transductantes <i>in vitro</i></b>	<b>151</b>
3.2.5.1. <i>Comprobación de la presencia del gen stx<sub>2</sub> en las cepas transductantes</i>	<b>152</b>
3.2.5.2. <i>Inducción del ciclo lítico de los bacteriófagos en las cepas transductantes</i>	<b>152</b>
3.2.5.2.1. Comprobación del nivel de inducción	<b>152</b>
3.2.5.2.2. Purificación de los bacteriófagos	<b>152</b>
3.2.5.2.3. Comparación del patrón RFLP del ADN de los bacteriófagos transducidos respecto al inducido de la cepa STEC original	<b>153</b>
3.2.5.2.4. Estudio de la funcionalidad del gen stx <sub>2</sub>	<b>153</b>
<b>3.2.6. Análisis del locus de inserción de los bacteriófagos</b>	<b>153</b>

<b>3.2.7. Observación de la morfología de los bacteriófagos purificados al microscopio electrónico de transmisión (MET)</b>	<b>155</b>
3.2.7.1. Preparación de las muestras	<b>155</b>
3.2.7.2. Observación mediante el microscopio electrónico de transmisión (MET)	<b>156</b>
<b>3.3- Resultados</b>	<b>157</b>
<b>3.3.1. Inducción del ciclo lítico de los bacteriófagos presentes en las cepas STEC aisladas y caracterización de los bacteriófagos inducidos</b>	<b>157</b>
3.3.1.1. Estimación del nivel de inducción	<b>157</b>
3.3.1.2. Extracción de ADN de los bacteriófagos inducidos de las cepas bacterianas	<b>159</b>
3.3.1.3. Análisis del patrón RFLP del ADN fágico	<b>160</b>
3.3.1.4. Observación de la morfología de los bacteriófagos más abundantes mediante el microscopio electrónico de transmisión (MET)	<b>161</b>
3.3.1.5. Análisis del espectro de huéspedes	<b>165</b>
3.3.1.5.1. Espectro de huéspedes de los fagos presentes en la cepa huésped determinado por las zonas de lisis observadas	<b>165</b>
3.3.1.5.2. Espectro de huéspedes de los fagos portadores del gen <i>stx<sub>2</sub></i>	<b>165</b>
3.3.1.6. Detección molecular del gen <i>stx<sub>2</sub></i> mediante PCR	<b>172</b>
3.3.1.6.1 Detección del fragmento genérico del gen <i>stx<sub>2</sub></i> de 378 pb	<b>172</b>
3.3.1.6.2. Detección de bacteriófagos portadores de las diferentes variantes del gen <i>stx<sub>2</sub></i>	<b>173</b>
3.3.1.6.3. Estudio de la diversidad genética de los bacteriófagos <i>stx<sub>2</sub></i>	<b>175</b>
3.3.1.6.3.1. Localización del gen <i>stx<sub>2</sub></i>	<b>175</b>
3.3.1.7. Análisis de los sitios de integración de los bacteriófagos <i>stx<sub>2</sub></i>	<b>177</b>
<b>3.3.2. Obtención de transductantes <i>in vitro</i></b>	<b>179</b>

3.3.2.1. Caracterización de las cepas transductantes	179
3.3.2.2. Morfología de los bacteriófagos transducidos	180
<b>3.4 - Discusión</b>	<b>183</b>
<i><u>DISCUSIÓN FINAL</u></i>	<b>193</b>
<i><u>CONCLUSIONES</u></i>	<b>201</b>
<i><u>ANEXO I</u></i>	<b>205</b>
<b><i>"Resumen de los resultados de los Capítulos II y III"</i></b>	
<i><u>ANEXO II</u></i>	<b>211</b>
<b><i>"Secuencia de los cebadores para la detección del gen stx<sub>1</sub>, el gen stx<sub>2</sub> y sus variantes"</i></b>	
<i><u>ANEXO III</u></i>	<b>215</b>
<b><i>"Materiales y Métodos generales"</i></b>	
<b>1.1. Preparación de Medios</b>	<b>217</b>
<b>1.2. Preparación de Reactivos y Soluciones</b>	<b>221</b>
<b>1.3. Métodos Generales</b>	<b>233</b>
<i><u>ANEXO IV</u></i>	<b>249</b>
<b><i>"Serotipos de cepas STEC descritos en la actualidad"</i></b>	
<i><u>REFERENCIAS</u></i>	<b>263</b>



## ABREVIATURAS

ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNasa	desoxirribonucleasa
ARN	ácido ribonucleico
ARNasa	ribonucleasa
ATCC	Colección americana de cultivos tipo (American Type Culture Collection)
CF	coliformes fecales
CSPD	disodium 3-(4-methoxyspiro{1,2-dioxietane-3,2'-(5'-chloro) tricyclo[3.3.1.137]decan}-4-yl)phenyl phosphate)
CT	coliformes totales
dNTPs	desoxinucleótidos-trifosfato
ddNTPs	didesoxinucleótidos-trifosfato
DO <sub>600</sub>	densidad óptica de la muestra a una longitud de onda de 600 nm
dUTP-DIG	Deoxi-uracil-trifosfato conjugado con una molécula de digoxigenina (Boehringer Mannheim)
EAgEC	<i>Escherichia coli</i> ( <i>E. coli</i> ) enteroagregativas
EC	<i>E. coli</i>
EDAR	estación depuradora de agua residual
EDTA	Ácido etileno-dinitrilo-tetraacético
EHEC	<i>E. coli</i> enterohemorrágicas
EIEC	<i>E. coli</i> enteroinvasivas
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
EPEC	<i>E. coli</i> enteropatógenas
ETEC	<i>E. coli</i> enterotoxigénicas
g	gramo
<i>g</i>	gravedades
GenBank	Base de datos moleculares de Los Alamos (EEUU)
HUS	síndrome urémico hemolítico
KDa	kilodalton
KV	kilovoltios
LPS	lipopolisacárido
MDa	megadalton
MET	microscopio electrónico de transmisión
<i>n</i> X	factor de concentración de una solución
NBT/BCIP	nitro blue tetrazolium chloride (5-Bromo-4 chloro-3-indolyl phosphate, toluidine salt)
NMP	número más probable

°C	grados Celsius
ON	"over night": incubación durante una noche (considerándose un periodo de 14 a 18 horas)
<i>p</i>	nivel de significación estadístico
p/v	relación peso/volumen
pb	pares de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
RFLP	restriction length fragment polymorfism
SDS	dodecil sulfato sódico
SSC	tampón cloruro sódico-citrato sódico
STEC	<i>E. coli</i> productoras de toxina Shiga
Stx	toxina shiga
<i>stx</i>	gen <i>stx</i>
Taq	abreviatura de <i>Thermus aquaticus</i> , bacteria de la cual se obtiene el enzima utilizado en la técnica de la PCR
TBE	tampón tris-borato-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-tetrametil-etilendiamina
Tm	"melting temperature", temperatura a la cual la mitad de las moléculas de ADN se encuentran en forma de cadena sencilla
Tris	tris (hidroximetil) aminometano
TTP	púrpura trombocitopénica trombótica
U	unidades internacionales de actividad
UFC	unidades formadoras de colonia
UPGMA	"unweighted pair-group method analysis"
UV	radiación ultravioleta
v.	ver
v/v	relación volumen/volumen
VTEC	<i>E. coli</i> productoras de Verotoxina
$\lambda$	longitud de onda

**NOTA:** En esta lista no se incluyen unidades de medida ni otras abreviaturas de uso convencional en publicaciones internacionales

## INTRODUCCIÓN GENERAL

---



## 1. Emergencia de nuevos patógenos

La mejora de la nutrición y de las condiciones de vida de la población que se produjo a partir de la primera mitad del siglo XIX (en los países más desarrollados), favoreció la disminución progresiva de la mortalidad y morbilidad debido a enfermedades infecciosas, principalmente diarreas infantiles, enfermedades respiratorias agudas y tuberculosis.

Posteriormente, en la segunda mitad del siglo XIX, con la incorporación de medidas de sanidad ambiental relacionadas con el abastecimiento del agua potable y con la mejora de la higiene en general, se redujeron algunas de las infecciones intestinales que por aquella época eran muy frecuentes, como el cólera, la fiebre tifoidea, la disentería, etc. Posteriormente, el desarrollo de las vacunas en el primer tercio del siglo XX y la difusión del uso de antibióticos a partir de la segunda mitad de siglo, también contribuyeron a disminuir el número de enfermedades infecciosas (43).

Sin embargo, el optimismo provocado por este elevado descenso, se frenó con la emergencia de nuevos patógenos como el virus del Ébola (1977), *Escherichia coli* O157:H7 (1982), el virus de la inmunodeficiencia humana (1983), el virus de la hepatitis C (1989), *Vibrio cholerae* O139 (1992) o el recientemente descrito virus del síndrome agudo respiratorio severo (SARS) (2003), la reemergencia de ciertas enfermedades que se consideraban bajo control, como es el caso de la tuberculosis (163), entre otras, o por el aumento de resistencias a los antibióticos producido en las últimas décadas con la emergencia de pneumococos y enterococos resistentes a la penicilina y vancomicina, respectivamente.

La emergencia de nuevos patógenos es consecuencia de diferentes fenómenos, algunos que son intrínsecos a los microorganismos y otros que son extrínsecos, entre los que destacan dos:

1) Introducción del agente infeccioso en la nueva población. El agente infeccioso puede haberse originado a partir de una cepa no virulenta, por la incorporación de genes que codifican los diversos factores de virulencia o por variación de una cepa virulenta ya existente. Esto es posible gracias a la existencia de elementos genéticos móviles, como los plásmidos, los transposones o los bacteriófagos, que en ocasiones codifican toxinas como es el caso de la verotoxina producida por *Escherichia coli* O157:H7.

2) Establecimiento y dispersión del patógeno entre sus nuevos huéspedes. A esta dispersión contribuye el tipo de sociedad en la que vivimos actualmente, los viajes, las relaciones internacionales, la industrialización, etc. (117).

## **2. Características generales de *Escherichia coli***

*Escherichia coli* (*E. coli*) es miembro de la familia *Enterobacteriaceae*, dentro de la cual se engloban, entre otros, los géneros *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Edwardsiella*, *Arizona*, *Proteus*, *Providencia*, *Yersinia*, *Morganella*, *Serratia* y *Hafnia*. Es una bacteria gramnegativa, anaerobia facultativa que forma parte de la microbiota normal del intestino del hombre y los animales de sangre caliente, siendo la más abundante de las bacterias anaerobias facultativas intestinales. Se excreta diariamente con las heces (entre  $10^8$ - $10^9$  UFC/g de heces) y, por sus características, es uno de los indicadores de contaminación fecal reciente más utilizados (5).

Junto con el resto de bacterias presentes en el intestino realiza diferentes funciones fisiológicas beneficiosas para el huésped como, por ejemplo, la síntesis de factores nutritivos esenciales o el procesamiento de los residuos alimentarios.

## **2.1- *E. coli* patógenas para el hombre**

*E. coli* ha sido considerada tradicionalmente como una bacteria comensal no patógena, aunque existen diversas cepas que son capaces de producir enfermedad. Se distinguen tres grandes grupos de *E. coli* patógenas según el tipo de infección que provocan. Un primer grupo está constituido por las cepas uropatógenas, que causan infecciones en el tracto urinario. Otro grupo, por cepas que causan sepsis y meningitis neonatal y, por último, existe el grupo de cepas enteropatógenas, que son responsables de un elevado número de infecciones gastrointestinales.

Dentro de este último grupo se han realizado diferentes clasificaciones. Una de las más utilizadas es la clasificación según sus factores de virulencia y patogénesis (Tabla 1), según la cual se distinguen las *E. coli* enterotoxigénicas (ETEC), *E. coli* enteroinvasivas (EIEC), *E. coli* enteroagregativas (EA<sub>g</sub>EC), *E. coli* enteropatógenas (EPEC) y *E. coli* enterohemorrágicas (EHEC) (101,126).

Posteriormente, con la observación de que algunos serotipos pertenecientes al grupo EPEC, como el O26 y el O111, eran capaces de producir las mismas lesiones y producían las mismas toxinas que los serotipos pertenecientes al grupo EHEC, hubo una reclasificación de dicho grupo, de manera que algunos serotipos clasificados tradicionalmente como EPEC fueron incluidos dentro del grupo EHEC.

En una revisión de dicha nomenclatura, se ha propuesto la creación de un nuevo grupo que estaría formado por las *E. coli* productoras de verotoxina (VTEC), también conocidas como *E. coli* productoras de toxina shiga (STEC). Este grupo englobaría al grupo de las EHEC y algunos serotipos que no poseen los factores de virulencia necesarios para causar patogénesis, aunque sí que son capaces de producir las toxinas shiga (130).

**Tabla 1.** Cuadro con los serogrupos descritos más frecuentemente aislados dentro de los diferentes grupos patogénicos

Flora normal	EPEC	ETEC	EIEC	STEC	Meningitis neonatal	Infección del tracto urinario	Septicemia
O1	O26	O6	O28	v. Anexo IV	O1	O1	O1
O2	O55	O8	O29		O6	O2	O2
O4	O86	O11	O112		O7	O4	O4
O5	O111	O15	O115		O16	O6	O6
O6	O114	O20	O124		O18	O7	O7
O7	O119	O25	O135		O83	O8	O8
O8	O125	O27	O136			O9	O9
O18	O126	O49	O143			O11	O11
O20	O127	O63	O152			O16	O18
O25	O128	O78	O164			O18	O22
O45	O142	O85	O167			O22	O25
O81	O158	O114				O25	O75
		O115				O62	
		O126				O75	
		O128					
		O148					
		O149					
		O153					
		O159					
		O166					
		O167					
		O169					

EPEC, *E. coli* enteropatógenas; ETEC, *E. coli* enterotoxigénicas; EIEC, *E. coli* enteroinvasivas; STEC, *E. coli* productoras de toxina shiga

Fuente: (43)

### **3. *Escherichia coli* productoras de toxina shiga (STEC)**

Como se ha indicado anteriormente, este grupo está formado por todas aquellas cepas de *Escherichia coli* capaces de producir unas potentes citotoxinas conocidas como verotoxinas (Vt) (93), toxinas Shiga-like (Stt) (132), o toxinas Shiga (Stx), nombre más frecuentemente utilizado en la actualidad por la mayoría de autores (125), y que será utilizado de ahora en adelante en esta tesis para designar este tipo de toxinas.

#### **3.1- Manifestaciones clínicas**

Las cepas STEC están asociadas mayoritariamente con la aparición de colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico, aunque no todas son capaces de producir enfermedad, según los factores de virulencia que presentan.

La colitis hemorrágica es una manifestación clínica caracterizada por la aparición de dolores abdominales, presencia de sangre en las heces y aparición, o no, de un poco de fiebre. Fue atribuida por primera vez en 1982 a una infección causada por *E. coli* O157:H7, un serotipo aislado con una baja frecuencia en heces humanas en aquella época (157, 213). No obstante, entre los años 60 y 70 ya se habían descrito algunos brotes de colitis hemorrágica, aunque por aquella época se desconocía el agente etiológico de esta enfermedad.

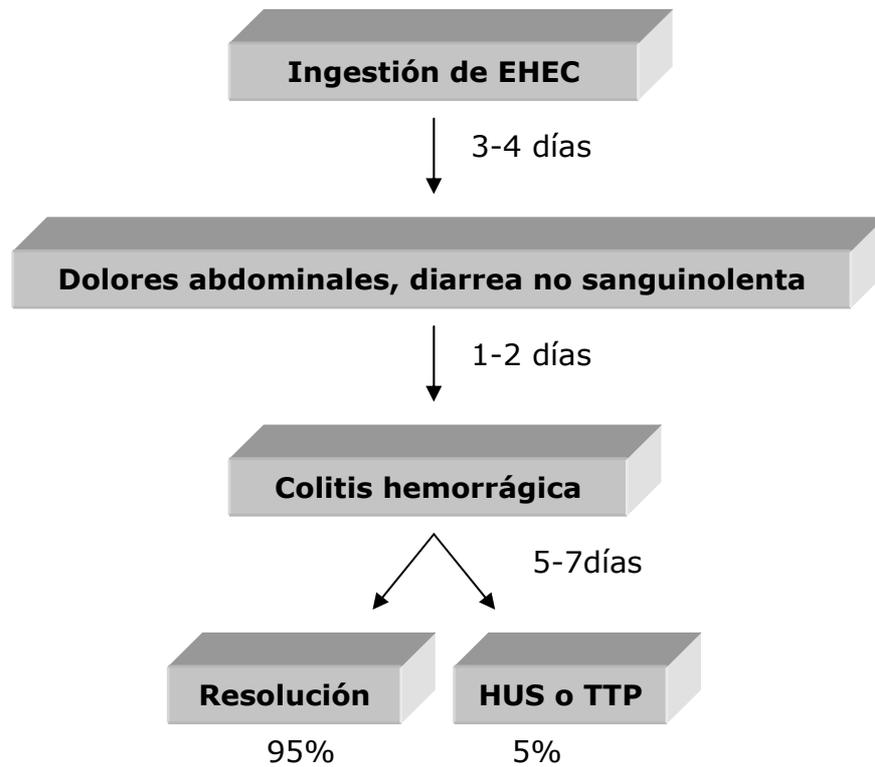
Posteriormente, se vio que este mismo serotipo también era capaz de provocar el síndrome urémico hemolítico, definido por una insuficiencia renal aguda, trombocitopenia y anemia microangiopática hemolítica (81). La tasa de mortalidad del síndrome urémico hemolítico oscila entre un 5% y un 10% (182, 80). Este síndrome fue descrito por primera vez en los años 50 y fue asociado con *Shigella dysenteriae* tipo I (designada inicialmente como *Shigella shiga*) y, aunque se desconocía el mecanismo de la enfermedad, en la mayoría de casos, estaba precedido por diarrea. Es interesante destacar la observación realizada por Kibel y Barnard en el año 1968 en el que hipotetizaron sobre la posible implicación de una cepa de *E. coli* enteropatogénica que habría adquirido un bacteriófago como agente causal del síndrome urémico hemolítico (88). Es más, por aquel entonces ya advertían de que el tratamiento con antibióticos podría

causar un daño celular elevado, provocando un aumento de la absorción de la toxina, lo que podría ocasionar un efecto adverso en el tratamiento de la infección. No obstante, el tratamiento con fosfomicina en uno de los brotes ocurrido en Japón redujo el número de casos de síndrome urémico hemolítico (218).

En los adultos aparece, más frecuentemente, una patología similar al síndrome urémico hemolítico conocida como púrpura trombocitopénica trombótica, en la que además del riñón, se ve afectado el sistema nervioso central, provocando síndromes neurológicos, como irritabilidad, letargia o convulsiones.

El cuadro de desarrollo de la infección se halla esquematizado en la **Figura 1**.

Asimismo, también se han descrito infecciones asintomáticas entre los individuos de la población, que no presentan ningún síntoma característico a pesar de ser portadores de las mismas cepas que han originado un determinado brote (185).

**Fig 1.** Desarrollo de la infección por cepas EHEC

**EHEC**, *E. coli* enterohemorrágica; **HUS**, síndrome urémico hemolítico; **TTP**, púrpura trombocitopénica trombótica

Fuente: (113)

## 3.2- Factores de virulencia

### 3.2.1. Las toxinas shiga

Unos de los principales factores de virulencia de estas cepas lo constituyen las toxinas que dan nombre al grupo, las toxinas shiga (Stx). Existen dos tipos principales de Stx, la Stx<sub>1</sub> y la Stx<sub>2</sub>, con características similares como su toxicidad sobre las líneas celulares Vero y HeLa y su estructura, formada por 1 subunidad A y 5 subunidades B. Ambos tipos de toxina comparten también el hecho de que se encuentran codificadas en bacteriófagos. Smith *et al.* (1983) fueron los primeros en describir la presencia de estos bacteriófagos en una cepa de *E. coli* O26:H19, a los que designó como H19A y H19B. O'Brien *et al.* (1984) obtuvieron resultados similares al estudiar una cepa *E. coli* O157:H7. Esta cepa

también llevaba integrados dos bacteriófagos portadores de los genes *stx*<sub>1</sub> y *stx*<sub>2</sub>, que fueron denominados 933J y 933W, respectivamente.

Los bacteriófagos han tenido un papel importante en la evolución de muchas bacterias. Los bacteriófagos atemperados, cuando se integran en el genoma bacteriano y se establece la lisogenia, pueden modificar las propiedades de la célula huésped, proceso que se conoce como conversión fágica. Además, una vez que un determinado bacteriófago ha infectado una célula y se ha establecido la lisogenia, la bacteria se hace inmune a la infección por un bacteriófago del mismo tipo. Muchas de las bacterias presentes en el medio ambiente son lisogénicas, lo que podría indicar que la conversión fágica puede conferirles una ventaja selectiva.

La presencia de genes que codifican factores de virulencia en el genoma de estos bacteriófagos constituye un mecanismo eficaz de diseminación de los mismos entre diferentes especies bacterianas. Este mecanismo podría haber provocado la amplia dispersión de los genes *stx* que se ha producido entre las diferentes poblaciones bacterianas. En condiciones normales, estos bacteriófagos se hallan integrados en el cromosoma bacteriano, y cuando se induce el ciclo lítico, se liberan grandes cantidades de bacteriófagos capaces de infectar a otras bacterias (1, 191, 169). La importancia de estos bacteriófagos en la dispersión de los genes *stx* queda puesta de manifiesto con el elevado número de serotipos en los que se han encontrado estos genes, e incluso en otras especies bacterianas diferentes de *Escherichia coli*, como *Citrobacter freundii* (171, 196) y *Enterobacter cloacae* (141).

Entre los dos grandes grupos de Stx se observan algunas diferencias. Mientras que el grupo de la Stx<sub>1</sub> es relativamente homogéneo (únicamente se ha descrito una variante, la Stx<sub>1c</sub> (222)) y es prácticamente idéntico a la toxina Shiga producida por *Shigella dysenteriae* tipo I, el grupo de la Stx<sub>2</sub> es un grupo muy heterogéneo del que se han descrito hasta 11 subtipos diferentes (31). No obstante, a pesar de esta diversidad se reconocen cinco variantes principales (Stx<sub>2</sub>, Stx<sub>2c</sub>, Stx<sub>2d</sub>, Stx<sub>2e</sub>, Stx<sub>2f</sub>) y la Stx<sub>2g</sub>, descrita recientemente (100).

Si bien estas toxinas no son suficientes para provocar enfermedad, se ha demostrado su acción patógena en ascas intestinales ligadas (129).

Este trabajo se ha centrado en el estudio del gen *stx<sub>2</sub>*, que codifica para la Stx<sub>2</sub>, por la importancia que esta toxina ha adquirido en las últimas décadas debido al número de brotes al que se ha asociado y la gravedad que éstos presentan. Epidemiológicamente, la Stx<sub>2</sub> aparece más frecuentemente asociada con casos severos de HUS que la Stx<sub>1</sub> (125) y las cepas más frecuentemente asociadas con enfermedades en humanos sólo llevan el gen *stx<sub>2</sub>* (112). Además, según algunos estudios de toxicidad, la Stx<sub>2</sub> es 1000 veces más tóxica que la Stx<sub>1</sub> (114).

También resulta de particular interés el hecho de que este gen esté codificado en bacteriófagos, lo que lo convierte en un modelo excelente para el estudio de la movilidad de este tipo de genes entre las diferentes poblaciones y del papel que podrían desempeñar las bacterias lisogenizadas por estos bacteriófagos y los propios bacteriófagos como reservorios de genes que en un determinado momento se podrían movilizar y provocar la emergencia de nuevos patógenos.

### **3.2.2. Intimina**

Otro de los principales factores de virulencia de las STEC es su sistema de adherencia al epitelio intestinal, a través de una proteína de membrana externa conocida como intimina, codificada por el gen *eaeA*, localizado en una región del cromosoma conocida como LEE (*locus of enterocyte effacement*). Este gen no es exclusivo de las STEC, sino que ya había sido descrito anteriormente en otras especies que causan lesiones del tipo A/E (*attaching and effacing*, adherencia y barrido de las microvellosidades) y son responsables de diferentes tipos de diarrea como la causada por las cepas EPEC.

### 3.2.3. Otros factores de virulencia

Otro de los factores de virulencia que podría estar implicado en patogénesis es la enterohemolisina hemorrágica (Ehly), conocida también como EHEC-HlyA, codificada por el gen *ehxA*. Esta hemolisina es diferente de la clásica hemolisina  $\alpha$ , presente en la mayoría de cepas uropatogénicas humanas (167).

Todos estos factores de virulencia serán tratados con más detalle en el Capítulo 2.

### 3.3- Emergencia de las cepas STEC

Tal y como se ha mencionado anteriormente, *Escherichia coli* O157:H7 es uno de los patógenos emergentes pertenecientes al grupo STEC al que se le ha dedicado más atención en las últimas décadas. Este serotipo fue asociado por primera vez con la aparición de dos brotes de colitis hemorrágica en los Estados Unidos en el año 1982 (157, 213), que afectaron a 47 personas que habían comido en diferentes restaurantes de la misma cadena, al que le siguieron numerosos brotes causados por éste y otros serotipos STEC.

*E. coli* O157:H7 estaría relacionada genéticamente con *E. coli* O55:H7, una cepa enteropatógena que causa diarrea en niños. Al igual que las cepas enteropatógenas, *E. coli* O157:H7 se puede adherir a las células epiteliales y producir lesiones características de adherencia y barrido de las microvellosidades (*attaching and effacing*). Otros factores de virulencia, y el antígeno O157, parecen haber sido adquiridos por transferencia horizontal y recombinación (214).

Estudios retrospectivos realizados en el Reino Unido, los Estados Unidos y Canadá sobre cepas de *E. coli* aisladas y serotipadas durante la década de los años 70, sugieren que el serotipo O157:H7 era por aquel entonces poco frecuente (60). Sin embargo, desde su emergencia en 1982 como patógeno humano, se ha producido un aumento notable de brotes originados por este serotipo, así como también de los originados por otros serotipos pertenecientes

al grupo STEC como el O26:H11, primer serotipo STEC no O157 aislado (102), el O111:H<sup>-</sup>, el O113:H21 o el O111:H8, entre otros (16).

No obstante, algunos de los brotes atribuidos a cepas EPEC ocurridos durante los años 60 y 70, podrían haber sido causados por cepas STEC, teniendo en cuenta que el síndrome urémico hemolítico ya había sido descrito en los años 50, como se ha citado anteriormente. Un ejemplo de ello es un brote ocurrido en Estados Unidos atribuido a *E. coli* O111, que podría haber implicado a cepas STEC. De hecho, algunos serotipos EPEC, como el O26:H11, el O111:H<sup>-</sup> y el O145:H<sup>-</sup> hoy en día se incluyen dentro de ambos grupos (EPEC y STEC).

### **3.4- Mecanismos de transmisión**

El ganado bovino es uno de los mayores reservorios de *E. coli* O157:H7 y otros STEC, aunque también se han encontrado en ovejas, cabras, ciervos, perros, gatos, caballos y pájaros de forma transitoria (64, 47, 194, 18, 8, 26, 204, 173). Las heces de estos animales o del hombre podrían contaminar la comida o el agua y constituir un riesgo de infección.

Se han descrito tres vías principales de transmisión de este patógeno (**Figura 2**):

- *Alimentos y agua contaminados.*

La mayoría de brotes causados por *E. coli* O157:H7 y otras cepas STEC están asociados al consumo de carne de vacuno poco cocinada, como las hamburguesas, por lo que se conoce también como enfermedad de las hamburguesas. No obstante, también se han producido brotes asociados al consumo de productos lácteos no pasteurizados o de vegetales (115), posiblemente contaminados con heces de animales. La contaminación de la carne ocurre principalmente en el matadero o en el procesamiento de la carne. Es la ruta principal mediante la cual estos patógenos entran en la cadena alimentaria.

También se han descrito brotes asociados a la utilización de aguas recreacionales y al consumo de agua contaminada (56, 189), siguiendo la ruta

de contaminación fecal-oral. Estudios recientes sobre la presencia de *E. coli* patógenas en medios acuáticos indican que estos lugares podrían ser un reservorio importante (99, 58, 95).

Sin embargo, se desconoce la prevalencia de serotipos STEC en el medio ambiente, lo cual podría servir como indicador de la circulación de estos patógenos en el entorno de la población. La prevalencia y diversidad de serotipos STEC serán tratadas a lo largo de este estudio.

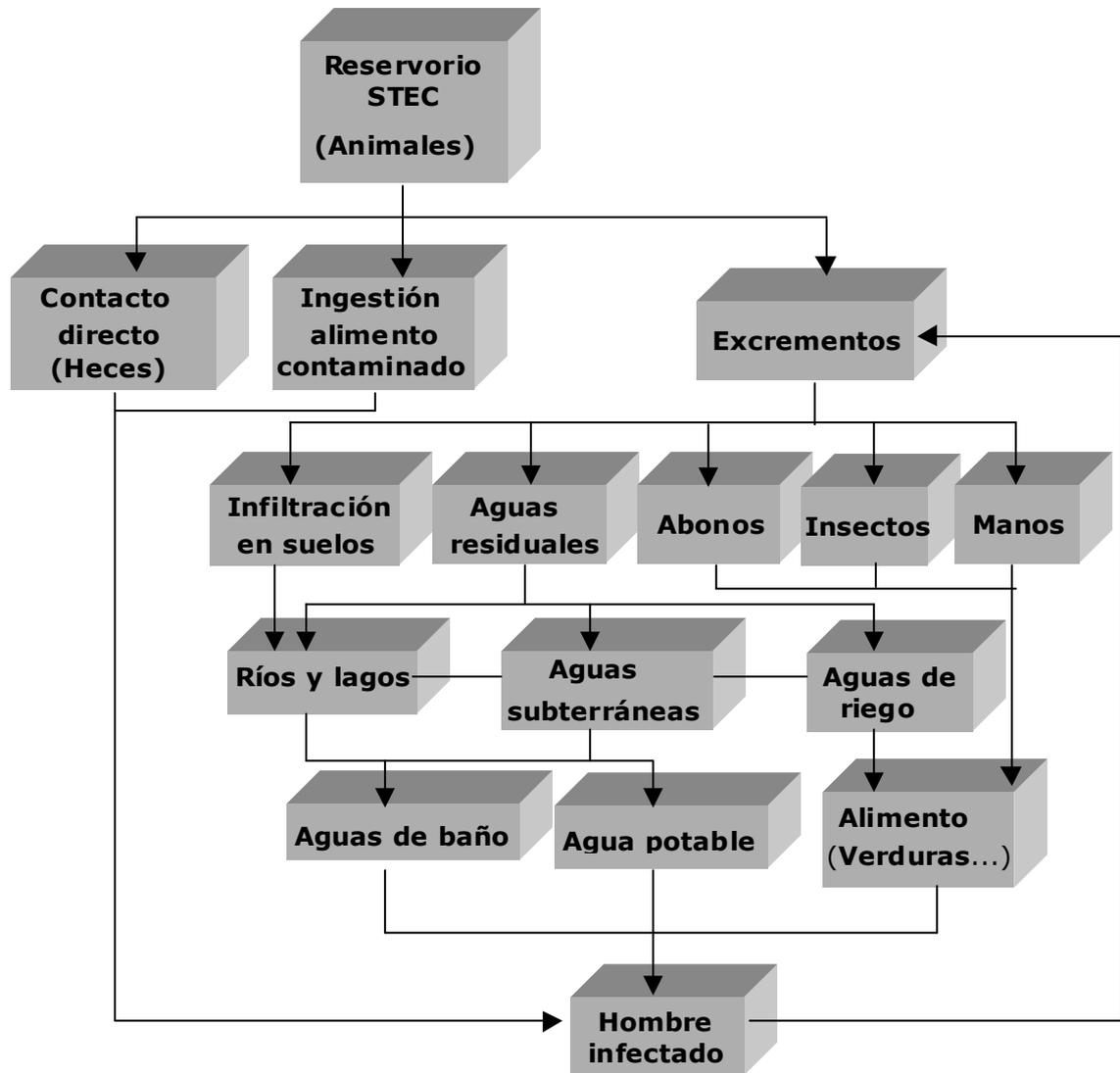
- *Transmisión directa de persona a persona*

Este tipo de transmisión tiene lugar cuando una persona sana tiene contacto con una persona que excreta STEC y se produce contaminación por vía fecal-oral. Es el mecanismo mediante el cual se originan casos secundarios en el transcurso de un brote y se produce mayoritariamente en niños pequeños que aún no han adquirido los hábitos de higiene.

- *Contactos directos con animales*

Se han descrito casos de transmisión a través del contacto directo con animales durante visitas a granjas. Esto se ve facilitado por la baja dosis infecciosa que presentan estos patógenos, situada entre 10 y 100 células. Existen algunos casos descritos en Inglaterra (77).

**Fig 2.** Esquema de las diferentes vías de transmisión de las cepas STEC.



### 3.5. Epidemiología

Desde su identificación como patógeno en 1982, *E. coli* O157:H7 ha sido asociado con la aparición de muchos brotes, mayoritariamente en los Estados Unidos, Canadá, Japón y el Reino Unido. Uno de los mayores brotes ocurridos en cuanto al número de afectados tuvo lugar en la ciudad de Sakai (Japón) en 1996 (190) en el que se vieron implicadas alrededor de 10000 personas, la mayoría de las cuales eran niños. Un total de 106 afectados desarrollaron el síndrome urémico hemolítico y 12 de ellos murieron como consecuencia de él. En Estados Unidos, el mayor brote ocurrió en el invierno de 1992-1993, en cuatro estados (Washington, Idaho, Nevada y California), que afectó a más de 700 personas, 55 de las cuales desarrollaron el síndrome urémico hemolítico. Uno de los mayores brotes ocurrido en Europa tuvo lugar en Escocia en 1996 con 500 afectados y 20 muertes. Muchos otros brotes se han ido sucediendo en diferentes partes del mundo. Se estima que en Estados Unidos ocurren al año 73480 casos de infección por *E. coli* O157:H7, 2168 hospitalizaciones y 61 muertes (59). No obstante, a pesar de que en algunos países como Canadá y Escocia en los que el número de casos identificados en los últimos años ha disminuído, en otros, como Finlandia y Suecia el número de casos ha sufrido un aumento (85, 106).

En cuanto a los serotipos implicados en los brotes causados por cepas STEC, el serotipo de *E. coli* O157 es uno de los más virulentos aunque, posteriormente, se vio que las cepas no-O157 también podían ser una causa importante de HUS en humanos y se propuso la necesidad de detectarlos. Sin embargo, su detección es mucho más compleja que en el caso del serotipo O157, ya que hasta el momento no se ha descrito ninguna característica fenotípica que permita diferenciarlas del resto de cepas de *E. coli* no patógenas, a parte de la producción de las toxinas shiga.

Según estudios recientes, se han descrito más de 400 serotipos STEC, de los cuales alrededor de 150 han sido asociados con infecciones humanas (<http://www.sciencenet.com.au/vtactable.htm>). Estas cepas son más prevalentes en los animales y como contaminantes de los alimentos, de manera que los hombres estarían más expuestos a ellas. Los serotipos STEC no O157 más frecuentemente aislados de humanos son el O4:H<sup>-</sup>, O45:H<sub>2</sub>, O111:H<sup>-</sup> y

O145:H<sup>-</sup> en Estados Unidos; O4:H5 y O111:H2 en Australia; O5:H<sup>-</sup>, O26:H11, O55:H7, O103:H2, O104:H2, O153:H25 y O163:H19 en el Reino Unido (16) y los serogrupos O26, O103, O111, O113, O145 y O128 en Europa continental (35).

Algunos de los factores que podrían haber contribuido a la amplia dispersión mundial de este patógeno podrían ser la crianza masiva de animales, la fertilización de los pastos con heces y el aumento del comercio internacional de animales y carnes, entre otros (7).

La distribución de *E. coli* O157:H7 a escala mundial no es homogénea, pues, si bien es el serotipo predominante en los Estados Unidos, Canadá, el Reino Unido y Japón, en la Europa continental, Australia y en los países latinoamericanos se detectan mayoritariamente otros serotipos STEC como los anteriormente descritos. En estos países en los que predomina, es la causa principal de diarrea sanguinolenta y el segundo o tercer patógeno bacteriano más frecuentemente aislado de coprocultivos, después de *Salmonella* y *Campylobacter* (182).

En la actualidad, el número de aislamientos de cepas no O157 sigue aumentando y siguen apareciendo nuevos serotipos capaces de provocar enfermedad. Así pues, en las últimas décadas se ha producido una emergencia del serotipo O111:H<sup>-</sup> en Italia y Australia, O111:H2 en Alemania, O103:H2 en Francia, los Estados Unidos y Alemania, O145:H5 en Japón y el O111:H8 en Estados Unidos. Asimismo, el serotipo O118 (H12, H16 y H30) está emergiendo en muchas partes del mundo (16).

En España, el número de brotes relacionados con el serotipo O157:H7 que se han producido desde su declaración como patógeno emergente es muy reducido. A parte de este serotipo, únicamente el O111:H<sup>-</sup> ha sido asociado a un brote de colitis hemorrágica. En la **Tabla 2** se resumen los diferentes brotes causados por STEC documentados en España.

**Tabla 2.** Relación de brotes causados por STEC documentados en España.

Lugar	Año	Afectados (situación)	Serotipos Stx	Nº afectados
Ibiza	1986	Turistas británicos en un hotel	O157:H7 Stx <sub>2</sub>	3 (+3 asintomáticos)
Islas Baleares	1994	Turistas británicos	O157:H7 Stx <sub>2</sub>	ND
Álava	1995	Chicos en una casa de campo	O111:H- Stx <sub>1</sub>	13
Fuerteventura	1997	Turistas europeos en un hotel	O157:H7 Stx <sub>2</sub>	14 (3 con HUS)
Guipúzcoa	1999	Niños en una guardería	O157:H7	8 (1 con HUS) (+6 asintomáticos)
Guipúzcoa	1999	ND	O157:H7	2 (1 con HUS) (+2 asintomáticos)
Barcelona	2000	Niños de tres colegios	O157:H7 Stx <sub>2</sub>	175 (6 con HUS)

HUS, síndrome urémico hemolítico; ND, dato no disponible

Fuente: J. Blanco. <http://www.secuslugo.lugo.usc.es/ecoli/BROTRES.html>

Tal como sucede en otros países, estudios recientes realizados en el Centro de Referencia de *E. coli* en Lugo (24) señalan que en España el número de cepas STEC es mucho más frecuente que el del serotipo O157, aunque su incidencia real se desconoce debido a la dificultad que presenta el aislamiento de estas bacterias por la ausencia de otros marcadores además de la producción de toxinas.

Este trabajo se ha dedicado al estudio de la prevalencia y diversidad de cepas STEC en el medio ambiente, desarrollando para ello un sistema de enumeración y aislamiento para estas bacterias, como será expuesto más adelante. La monitorización de los genes *stx* en el medio ambiente constituye una herramienta para entender su ecología y su implicación en la emergencia de cepas patogénicas.

#### **4. Objetivos generales**

Este trabajo se ha centrado en el estudio de la ecología del gen *stx*<sub>2</sub> en aguas residuales, para lo cual ha sido estructurado en tres capítulos en los que se desarrollan los siguientes objetivos:

1. - Puesta a punto de una metodología para poder estimar la frecuencia del gen *stx*<sub>2</sub> en las diferentes poblaciones bacterianas presentes en aguas residuales, así como también el desarrollo de un sistema de aislamiento de las cepas portadoras del gen *stx*<sub>2</sub> mediante la utilización de un método no selectivo para un serotipo concreto de STEC. Estimación del número de bacterias portadoras del gen *stx*<sub>2</sub> en aguas residuales de diferentes orígenes, tanto de origen urbano como animal. Enumeración y aislamiento de cepas de *E. coli* O157 en estas aguas.

2. - Caracterización fenotípica de las diferentes cepas bacterianas aisladas portadoras del gen *stx*<sub>2</sub>, estudio de los diferentes serotipos y análisis de los diferentes factores de virulencia que éstas presentan.

3. - Análisis de los bacteriófagos portadores del gen *stx*<sub>2</sub> que se encuentran integrados en el cromosoma de las bacterias aisladas, en cuanto a su morfología, capacidad infectiva y posibilidad de transmitir el carácter toxigénico a nuevas bacterias.



## CAPÍTULO 1

---

*"Adaptación y evaluación de métodos y protocolos de aislamiento de cepas STEC en muestras de origen ambiental y estudios de prevalencia de estas cepas"*



## 1.1- Introducción

Según diversos estudios, *E. coli* es capaz sobrevivir en el medio ambiente. Se ha descrito que, ante diferentes factores de estrés, como la falta de nutrientes o temperaturas extremadamente bajas, este microorganismo es capaz de entrar en un estado durmiente en el que estas bacterias se mantienen viables pero no son capaces de crecer en los medios de cultivo clásicos, donde anteriormente sí que eran capaces de hacerlo, conocido como estado viable pero no cultivable (207). No obstante, también se ha visto que, en algunas circunstancias, cuando se recuperan las condiciones ambientales óptimas, adquieren de nuevo la capacidad de multiplicarse, siendo capaces de colonizar el intestino. Así pues, el medio ambiente constituye un reservorio para que estos microorganismos puedan volver a colonizar su hábitat principal y, en algunos casos, que variedades patógenas sean capaces de introducirse en él y causar enfermedad. Según algunos estudios, la persistencia en el medio ambiente de *E. coli* O157, y de otras STEC, puede verse favorecida por la presencia de protozoos. Estos estudios ponen de manifiesto la importancia de éstos para la transmisión de patógenos o como reservorios en el medio ambiente (10, 32) aunque, según otros estudios, la depredación de las bacterias por los protozoos provocaría su disminución en el medio ambiente (66).

La mayoría de brotes originados por cepas STEC han sido asociados al consumo de carne de vacuno, principalmente picada y poco cocinada. Otros alimentos que se han visto implicados incluyen productos lácteos, mayonesa, sidra, frutas y vegetales (115).

No obstante, también se han descrito diferentes brotes asociados al agua, en los que ha sido implicada tanto el agua de consumo como el agua recreacional (111, 56, 36, 135, 189, 104, 160).

Uno de los brotes que adquirió una amplia difusión a escala mundial, debido al elevado número de personas afectadas (más de 2000 casos severos y 7 muertes), ocurrió en Walkerton, Ontario (Canadá) en el año 2000 (68). El brote se produjo por la contaminación del sistema de abastecimiento de agua potable en el transcurso de una tormenta, por el agua de escorrentía que estaba

contaminada con heces de ganado vacuno (68). El patógeno implicado fue *E. coli* O157:H7, uno de los serotipos más virulentos asociado a brotes de colitis hemorrágica (130).

La contaminación de los sistemas de abastecimiento de agua es un problema que se da principalmente en áreas rurales donde la existencia de depósitos de agua y el consumo de ésta sin tratamientos previos como la cloración supone un riesgo de infección por microorganismos patógenos.

En otros muchos casos en los que se ha relacionado el medio ambiente con la aparición de algún brote, no ha sido posible identificar el agente etiológico del brote (36), debido a la dificultad de aislar patógenos en el medio ambiente. Los patógenos, normalmente, se encuentran en proporción mucho menor que el resto de bacterias presentes en el medio, dificultando así su detección y aislamiento.

Se han descrito diversos métodos para la detección y el aislamiento de *E. coli* O157, aprovechando que es un grupo muy homogéneo y comparte una serie de características bioquímicas particulares que permite diferenciarlas del resto de *E. coli*. Son incapaces de fermentar el sorbitol en 24 horas y no poseen el enzima  $\beta$ -D-glucuronidasa (153). Esto ha hecho posible el desarrollo de medios selectivos y diferenciales como el Sorbitol MacConkey Agar, medio usado rutinariamente en el aislamiento de este serotipo, que contiene sorbitol como fuente de carbono. A este medio se le ha añadido dos antibióticos, cefixima y telurito, para crear el agar CT-SMAC, uno de los medios más frecuentemente utilizados para su detección (221). Otros medios desarrollados incluyen el Chromagar o el Rainbow Agar (14, 15). Además, se han desarrollado sistemas para facilitar el aislamiento de este serotipo como la separación inmunomagnética (217). No obstante, se han descrito diferentes variantes como el serotipo *E. coli* O157:H<sup>-</sup> (4), un serotipo muy frecuente en Alemania, que es capaz de fermentar el sorbitol, con lo que pasaría inadvertido con los métodos más frecuentemente usados en clínica para la detección de *E. coli* O157.

La detección de bacterias productoras de Stx no pertenecientes al serotipo O157:H7 se hace difícil debido al elevado número de serotipos STEC existentes

(que sigue aumentando) y a la ausencia de una característica fenotípica diferencial que los unifique.

Un método adecuado para el cribaje y el aislamiento de cepas no-O157 tendría que basarse en la detección de las toxinas Stx o de los genes que las codifican, ya que hasta el momento es la característica común más frecuente para todas ellas. Se han desarrollado métodos para detectar las toxinas como la demostración del efecto citotóxico producido sobre la línea celular Vero, métodos inmunológicos para la detección de las toxinas (ELISA) (84) o técnicas moleculares que ponen de manifiesto la presencia del gen, como la PCR (53), pero estos son muy costosos y lentos debido a que se hace necesario aislar una cepa y demostrar que es capaz de producir estas toxinas.

En consecuencia, se piensa que el número de infecciones ocasionado por bacterias que no sean *E. coli* O157:H7 podría estar infravalorado. De hecho, la detección de STEC sólo la realizan un pequeño grupo de laboratorios especializados, debido a su dificultad.

La monitorización de las cepas STEC en el medio ambiente podría aportar información importante a cerca de la epidemiología de las infecciones causadas por estos patógenos. Sin embargo, como se ha mencionado anteriormente, la identificación de estos patógenos en el medio ambiente, el cual presenta números muy reducidos de dichos patógenos, se ve limitada por la falta de un medio de enriquecimiento y selectivo para los mismos.

Por las características que se han mencionado anteriormente, la mayoría de estudios sobre prevalencia y supervivencia, se han centrado en el serotipo O157 (155, 90, 207). En cuanto al serotipo O157:H7, se ha observado una estacionalidad tanto en la excreción en las heces de los animales como en el número de infecciones declaradas, coincidiendo la mayor incidencia con los meses de junio a septiembre. La prevalencia oscila entre el 5 y el 37 % en los animales (38).

En cuanto al resto de cepas STEC, Kurokawa *et al.* (95) describieron un sistema de enumeración de bacterias portadoras del gen *stx*<sub>2</sub> utilizando la técnica

de la PCR *in situ* directa, pero éste es un sistema lento y tedioso, y no permite valorar grandes volúmenes de muestra. Otros métodos descritos recientemente se basan en la utilización de la PCR cuantitativa (103), aunque esta técnica no es de utilidad a concentraciones inferiores a  $10^3$  células/ml. Sin embargo, este inconveniente puede solventarse en muestras en las que es posible realizar una concentración de las mismas sin que las sustancias presentes inhiban la PCR. En muestras de agua residual, la presencia de inhibidores hacen que estas muestras no puedan concentrarse sin que se vea afectada la PCR, y junto con la concentración baja de estas bacterias hace que esta técnica no pueda aplicarse.

A pesar de los numerosos brotes en los que el agua ha sido identificada como vehículo de transmisión del patógeno, son pocos los estudios realizados sobre la presencia de cepas de *E. coli* productoras de  $Stx_2$  en ambientes acuáticos. Algunos estudios han demostrado la presencia de bacteriófagos portadores del gen  $stx_2$  libres en aguas residuales (120, 123). Sin embargo, se desconoce si el gen  $stx_2$  está igualmente distribuido en las bacterias presentes en estos ambientes.

### **1.1.1. Objetivos**

Uno de los objetivos de este estudio es la puesta a punto de un método que permita cuantificar el número de bacterias portadoras del gen  $stx_2$  en muestras ambientales y así conocer la distribución de este gen en el medio ambiente. Este método combina la técnica del número más probable (NMP) (57) con la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permitiendo cuantificar no sólo las STEC, sino también otras bacterias no *E. coli* que por transducción o conjugación hayan podido adquirir el gen  $stx_2$  y puedan actuar de reservorio del gen en el medio ambiente.

Después de valorar la proporción de bacterias portadoras del gen  $stx_2$  respecto a los coliformes fecales, totales y *E. coli* (los indicadores bacterianos de contaminación fecal más frecuentemente utilizados en las regiones templadas) se planteó el desarrollo de un sistema de detección de estas bacterias que a su vez permitiera el aislamiento de las mismas, para su posterior caracterización.

El método elegido fue el de la hibridación colonial mediante la utilización de una sonda de ADN que hibrida con un fragmento de 378 pb del gen de la *Stx*<sub>2</sub>. Los resultados indican que este método puede utilizarse como un sistema rápido y eficaz para la enumeración y posterior aislamiento de bacterias portadoras del gen *stx*<sub>2</sub> en muestras ambientales, de gran utilidad en estudios epidemiológicos.

Paralelamente, se planteó analizar la prevalencia de *E. coli* O157 en el área metropolitana de Barcelona (España), así como también en uno de los mataderos municipales de la misma ciudad, después de que en el año 2000 tuviera lugar un brote de colitis hemorrágica asociado a este patógeno atribuido al consumo de salchichas. En este brote, como se ha indicado en la **Tabla 2** de la Introducción General, se vieron afectadas alrededor de 200 personas, la mayoría de las cuales eran niños menores de 10 años de edad, desencadenándose el síndrome urémico hemolítico en tres de ellos (6).

El método escogido para este análisis fue la técnica de la separación inmunomagnética en combinación con la siembra en agar CT-SMAC (217), seguido de una detección inmunológica utilizando anticuerpos monoclonales contra el antígeno O157.

Así pues, los objetivos de este capítulo se resumen en los siguientes apartados:

- 1- Desarrollo de una metodología para la cuantificación de cepas portadoras del gen *stx*<sub>2</sub> en aguas residuales.
- 2- Análisis de la prevalencia de las cepas *stx*<sub>2</sub> en muestras de aguas residuales de diferentes orígenes.
- 3- Desarrollo de una metodología para la detección y aislamiento de cepas portadoras del gen *stx*<sub>2</sub> mediante un método no selectivo para ningún serotipo STEC en concreto, para su posterior caracterización.
- 4- Cuantificación de *E. coli* O157 en aguas residuales y aislamiento de estas cepas para su posterior caracterización.



## **1.2 - Materiales y Métodos**

### **1.2.1. Cepas bacterianas y medios de cultivo utilizados**

La cepa de *E. coli* O157:H7 (ATCC 43889), que posee el gen *stx*<sub>2</sub> y produce la Stx<sub>2</sub>, fue utilizada como control positivo en todos los experimentos de enumeración y detección de cepas portadoras del gen *stx*<sub>2</sub>. Como controles negativos se utilizaron varias cepas de *E. coli*, entre las cuales se incluyen la cepa de *E. coli* O157:H7 (ATCC 43888), la cepas de laboratorio de *E. coli* C600, CN13, DH5 $\alpha$  y otra cepa de *E. coli* (ATCC 11303). Estas cepas no producen ni poseen los genes para la producción de Stx<sub>2</sub>.

Los medios de cultivo utilizados fueron el agar de triptona de soja (TSA) (Difco, Le Pont de Claix, Francia), para el mantenimiento de estas cepas, y el caldo de triptona de soja (TSB) (Difco, Le Pont de Claix, Francia), para la preparación de los cultivos líquidos necesarios para la extracción del ADN bacteriano. Estas cepas se incubaron a 37 °C y sin agitación durante aproximadamente 6 h (hasta llegar a la fase exponencial), para los estudios de sensibilidad del método de enumeración. Alternativamente, para la extracción rutinaria de ADN se utilizaron cultivos de 24 h.

### **1.2.2. Toma de muestras**

Se recogieron un total de 58 muestras de agua residual urbana no tratada de 5 estaciones depuradoras de agua residual (EDAR), situadas en diferentes poblaciones de Catalunya (España), 15 de agua residual de matadero de diferentes especies animales (ganado bovino, porcino y mezcla de bovino, ovino, caprino y aves de corral) y 3 muestras de heces de ganado bovino.

Las características de las EDAR que fueron objeto del muestreo son las siguientes:

EDAR 1 (Gavà, Barcelona). Depuradora de tratamiento biológico (lodos activados), que recibe el agua residual procedente de una zona urbana de aproximadamente 400000 habitantes.

EDAR 2 (St. Adrià, Barcelona). Depuradora de tratamiento fisico-químico (floculación con electrolitos), cuando se realizó el estudio (en la actualidad de tratamiento biológico), que recibe el agua residual generada por una población de aproximadamente 1400000 habitantes.

EDAR 3 (Taradell, Barcelona). Depuradora de tratamiento biológico (lodos activados con precipitación simultánea por electrolitos), receptora de agua procedente de una población de 5000 habitantes

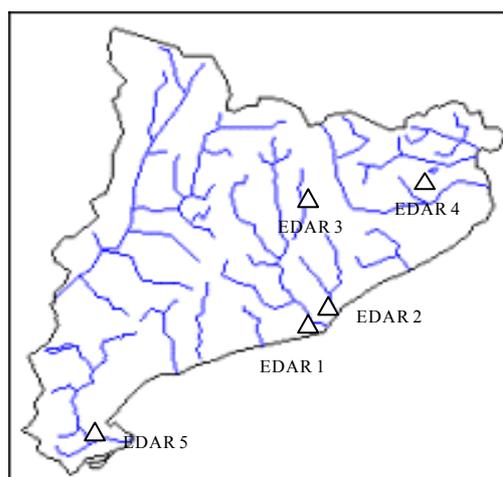
EDAR 4 (Girona). Planta que dispone de un sistema de lagunaje para el tratamiento del agua residual de una población de 1500 habitantes.

EDAR 5 (Ampolla, Tarragona). Esta planta realiza un tratamiento biológico (lodos activados) del agua residual de una población de 1500 habitantes, y dispone de un tratamiento terciario de lagunaje.

Su distribución geográfica queda reflejada en la **Figura 1.1.**

Además, se tomaron algunas muestras de agua del efluente de las EDARs 4 y 5, tras el tratamiento secundario (lodos activados) y terciario (lagunaje) del agua residual, con el objetivo de valorar la eliminación de las bacterias portadoras del gen *stx*<sub>2</sub> con relación a la eliminación de los coliformes totales, fecales y *E. coli* en el tratamiento del agua residual.

Las muestras fueron tomadas asépticamente y transferidas a contenedores estériles. Posteriormente fueron transportadas al laboratorio con un sistema de refrigeración a 4 °C para ser analizadas en un plazo máximo de 6 h desde su recogida.

**Fig 1.1.** Localización de las plantas depuradoras analizadas.

Esquema del Mapa de Catalunya (España)

### 1.2.3. Enumeración de indicadores bacterianos en las muestras analizadas

Los indicadores bacterianos de contaminación fecal analizados fueron los coliformes totales, los coliformes fecales y *E. coli*. La técnica utilizada para la enumeración fue la filtración por membrana (5). Para ello se realizó una serie de diluciones decimales de las muestras en Ringer 1/4 (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) y se filtró 1 ml de la correspondiente dilución, nuevamente diluida en 9 ml de Ringer 1/4, a través de membranas de nitrocelulosa de una porosidad de 0,44  $\mu\text{m}$  (Millipore, Mosheim, Francia). Los medios y las condiciones utilizados para el crecimiento de los coliformes fecales y de los otros dos indicadores, fueron el agar mFC (Difco, Le Pont de Claix, Francia) a 44,5  $^{\circ}\text{C}$  y el agar Chromocult para coliformes (Merck, Darmstadt, Alemania) a 37  $^{\circ}\text{C}$ , respectivamente, con un tiempo de incubación de 24 horas.

### 1.2.4. Enumeración de cepas portadoras del gen *stx*<sub>2</sub>

Para la enumeración de las cepas portadoras del gen *stx*<sub>2</sub> se diseñó un sistema basado en la combinación de la técnica del número más probable (NMP) (57) y la PCR anidada para el gen *stx*<sub>2</sub> descrita por Muniesa y Jofre (120).

#### **1.2.4.1. Extracción de ADN bacteriano**

Se valoró la eficiencia de diferentes métodos de extracción de ADN bacteriano. Los métodos evaluados fueron los siguientes:

- A) Extracción de ADN mediante el Kit comercial de la Matriz InstaGene (Bio-Rad, Richmond, USA; v. Anexo III).
  
- B) Extracción de ADN mediante la utilización de un tampón de lisis preparado en el laboratorio formado por Tris-HCl 10 mM (Calbiochem, Merck, Darmstadt, Alemania), EDTA 1 mM (Tritiplex III, Merck, Darmstadt, Alemania) y Tritón-X-100 0,5% (Calbiochem, Merck, Darmstadt, Alemania).

Para valorarlos, se realizó una extracción de ADN de 1 ml de una serie de diluciones decimales de un cultivo de 6 h a 37 °C de la cepa ATCC 43889, utilizando los dos métodos de extracción descritos. La concentración de las diluciones se evaluó en paralelo mediante la enumeración de células viables por extensión utilizando agar TSA. A partir de los resultados obtenidos, se escogió el método B para la realización de los siguientes ensayos.

Para reducir al máximo la presencia de posibles partículas que podrían interferir con la extracción de ADN y la posterior PCR anidada, las muestras fueron centrifugadas a 250 x *g* durante 15 min a 4 °C. Para comprobar que este paso de centrifugación no afectaba a los recuentos obtenidos se realizó una enumeración de los indicadores bacterianos antes y después de la centrifugación, mediante la realización de diluciones decimales seriadas y la enumeración de viables en placa en el correspondiente agar.

Después de esta centrifugación, se tomaron 5 alícuotas de 10 ml, 1 ml, 0,1 ml y 0,01 ml del sobrenadante y se centrifugaron a 16000 x *g* para obtener el precipitado bacteriano. Se eliminó el sobrenadante y se añadieron 200 µl del tampón de lisis, anteriormente descrito. Las muestras se agitaron con un vórtex y se incubaron a una temperatura de 100 °C durante 10 minutos. Finalmente, se

centrifugaron a 16000 x g durante 5 minutos y 2 µl del sobrenadante se utilizó para la realización de la PCR.

#### **1.2.4.2. Detección del gen *stx*<sub>2</sub>: amplificación de un fragmento del gen mediante la técnica de la PCR**

En una primera aproximación, se planteó la utilización de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección del gen *stx*<sub>2</sub>.

Todos los ensayos de PCR se realizaron en volúmenes finales de 25 µl que contenían MgCl<sub>2</sub> 2 mM (Eppendorf, Hamburg, Alemania), Tampón de PCR 10X (Eppendorf, Hamburg, Alemania), cada uno de los cebadores 0,3 pM, dNTP 200 µM, Taq ADN polimerasa 2 U (Eppendorf, Hamburg, Alemania) y 2 µl de muestra de ADN, ajustando el volumen final con agua bidestilada estéril. Los cebadores utilizados en este estudio fueron descritos por Muniesa y Jofre (120). La secuencia nucleotídica de estos cebadores, como también la de los demás cebadores utilizados en este estudio, se indican en el Anexo II.

Las diferentes fases y el número de ciclos utilizados para la realización de la primera PCR fueron los siguientes:

A) Desnaturalización: 5 min a 94 °C

B) Amplificación durante 35 ciclos:

Desnaturalización: 1,5 min a 94 °C

Unión de los cebadores "annealing": 1 min a 55 °C

Elongación: 1 min a 72 °C

C) Elongación final: 4 min a 72 °C

D) Conservación de la muestra: tiempo indefinido a 4 °C

Todos los ensayos de PCR fueron realizados en el GeneAmp 2400 PCR (Perkin Elmer, Applied Biosystems, Barcelona, España).

#### **1.2.4.3. Aumento de sensibilidad de la PCR: PCR anidada**

Teniendo en cuenta los primeros resultados obtenidos en las muestras de agua residual se planteó la realización de una PCR anidada para aumentar la sensibilidad de la PCR. Para la realización de la PCR anidada se utilizaron las mismas condiciones experimentales que el caso de la primera PCR, exceptuando la temperatura de la fase de "annealing", que fue de 50 °C, por la menor T<sub>m</sub> de los cebadores internos (v. Anexo II)

Los productos obtenidos en la PCR con los cebadores externos y en la PCR anidada, de 378 y 169 pb se visualizaron mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1,5 y al 2%, respectivamente, teñido con bromuro de etidio (161).

#### **1.2.4.4. Determinación de la sensibilidad de la PCR anidada**

Se realizó una serie de diluciones decimales en Ringer ¼ (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) de un cultivo en TSB de 6 h a 37 °C y sin agitación de la cepa ATCC 43889, con el fin de establecer el límite de detección de esta técnica. A partir de dichas diluciones se realizó una enumeración de células viables en placa en TSA inoculando un volumen de 100 µl en cada placa, e incubándose a 37 °C. Paralelamente, se realizó una extracción de ADN de 1 ml de cada una de las diluciones y se realizó una PCR anidada de cada una de las extracciones de acuerdo con la técnica explicada anteriormente.

Para valorar los efectos inhibitorios de las sustancias presentes en el agua residual, se tomó por duplicado 1 ml de cada una de las diluciones anteriores de la cepa ATCC 43889 y se centrifugó a 16000 x g durante 4 minutos para recoger las células. A continuación, las células de cada una de las réplicas se resuspendieron en 1 ml de una muestra de agua residual que había sido sometida a una de estas dos condiciones experimentales:

- A) Tratamiento con autoclave (15 min a 121 °C), para eliminar las células vivas.
- B) Filtración a través de un filtro de 0,22 µm de diámetro de poro (Millipore, Mosheim, Francia), para eliminar las partículas de tamaño superior a éste, entre ellas bacterias, y posterior inoculación con 10<sup>4</sup> UFC/ml de la cepa ATCC 11303, no portadora del gen *stx*<sub>2</sub>, para estudiar el efecto de competición de los cebadores por el ADN molde, en presencia de una gran cantidad de ADN interferente.

Seguidamente, se realizó una extracción de ADN de acuerdo con método descrito anteriormente (método B) y se realizó una PCR anidada de cada réplica. Como control negativo de cada condición experimental se utilizó 1 ml de cada muestra sin inocular con la cepa ATCC 43889, portadora del gen *stx*<sub>2</sub>, para controlar que el número de bacterias de las que se había extraído ADN era debido a la cantidad de bacterias que se habían inoculado y no a las que originalmente estaban presentes en el agua.

Con el fin de descartar cualquier interacción por amplificación del ADN libre presente en el agua residual, se realizó un tratamiento con ADNasa. Para ello se utilizaron 10 U de ADNasa (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, Inglaterra) por cada mililitro de muestra de agua residual. Como control positivo se utilizó una muestra que había dado un resultado positivo al realizar la técnica de la PCR anidada.

Finalmente, se comprobó el efecto inhibitorio del agua residual sin haber sido sometida a ningún tratamiento, mediante la enumeración de las mismas diluciones de la cepa ATCC 43889 utilizadas anteriormente.

#### **1.2.4.5. Estimación del número de bacterias portadoras del gen *stx*<sub>2</sub> en muestras de agua residual**

A partir de los resultados positivos obtenidos por la técnica de la PCR anidada, atendiendo a las diluciones seriadas, se estimó el número de posibles genes *stx*<sub>2</sub> basándose en el método del NMP (5).

Para evaluar esta metodología, se realizó un experimento consistente en la enumeración de un inóculo experimental de la cepa ATCC 43889 preparado en el laboratorio en agua residual. Se tomaron 5 alícuotas de 1 ml, 0,1 ml y 0,01 ml por triplicado y se aplicó el método aquí descrito. Posteriormente, este procedimiento se aplicó a las muestras ambientales de agua residual.

Teniendo en cuenta la elevada sensibilidad de la PCR anidada observada, se realizaron los siguientes controles negativos:

- 1) Control de la extracción del ADN (3 controles): Se tomaron alícuotas de 1 ml, 0,1 ml y 0,01 ml del tampón de lisis y se aplicó el método de extracción descrito anteriormente, en paralelo con las muestras. Se utilizaron 2 µl de cada una de las alícuotas para la realización de la PCR anidada.
- 2) Control de la primera PCR: Utilización de 2 µl de agua bidestilada estéril para la realización de la primera PCR.
- 3) Control de la PCR anidada (2 controles): Utilización de 2 µl de agua bidestilada estéril, como en el caso anterior, y utilización del control negativo de la primera PCR para la realización de la PCR anidada.
- 4) Control bacteriano: Extracción de ADN de la cepa ATCC 43888 y procesamiento igual que el resto de muestras en la PCR anidada.

Los controles positivos utilizados fueron los siguientes:

- 1) Control bacteriano: Extracción de ADN de la cepa ATCC 43889, y procesamiento igual que el resto de las muestras.
- 2) Control de inhibidores de PCR presentes en las muestras: Este control consistió en la adición de 1 ml de agua residual al realizar una extracción de ADN de la cepa anterior que se encontraba a una concentración aproximada de  $10^2$  UFC/ml (calculada experimentalmente) y el procesamiento habitual de las muestras.

#### **1.2.4.6. Hibridación ADN-ADN mediante la técnica de "Dot Blot"**

Los productos obtenidos en la PCR anidada fueron confirmados mediante la técnica de la hibridación ADN-ADN utilizando la técnica de *Dot Blot* tal como se describe en el apartado de Materiales y Métodos generales (Anexo III). Para la detección del gen *stx*<sub>2</sub> se utilizó una sonda interna marcada con digoxigenina, consistente en un fragmento de 26 pb de la subunidad A de la *Stx*<sub>2</sub> (120).

#### **1.2.4.7. Secuenciación**

Adicionalmente, se realizó una secuenciación automática de algunos de los amplicómeros obtenidos mediante la PCR anidada, utilizando el Kit de secuenciación Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit 3.1 (Applied Biosystems, Estados Unidos) y el secuenciador ABI PRISM 3700 (Applied Biosystems, Estados Unidos), en las dos direcciones, utilizando los cebadores internos. La metodología utilizada se indica en el Anexo III.

Esta secuenciación permitió comprobar la identidad de los fragmentos de ADN que habían sido amplificados con la PCR anidada.

Las secuencias obtenidas se compararon con las secuencias depositadas en el GenBank y el EMBL, utilizando el programa BLAST, disponible en la página web: <http://www.ncbi.nlm.nih.com> (Wisconsin Package Version 10.2, Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisconsin, Estados Unidos).

## **1.2.5. Desarrollo de una metodología para el aislamiento de cepas portadoras del gen *stx*<sub>2</sub>**

### **1.2.5.1. Hibridación colonial**

El método utilizado para el aislamiento de cepas portadoras del gen *stx*<sub>2</sub> fue el de la hibridación colonial. Con el fin de aumentar el número de cepas analizadas en cada ensayo se utilizaron placas de agar de 140 mm de diámetro, en lugar de las tradicionalmente utilizadas (de 90 mm), mientras que el agar utilizado fue el agar Chromocult (Merck, Darmstadt, Alemania), que permite el crecimiento de los coliformes totales.

Las colonias crecidas en las placas se transfirieron a membranas de nylon Hybond N<sup>+</sup> (Amersham, Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, Inglaterra) manteniendo en contacto la membrana con la superficie del agar durante 1 min. A continuación, se retiró la membrana cuidadosamente \* (siempre con las células en la cara superior) y se añadió una colonia crecida en placa de las cepas ATCC 43888 y 43889, como controles negativo y positivo, respectivamente. A continuación, se siguió con el procesamiento de la membrana. La desnaturalización, neutralización y lisis celular se realizaron siguiendo el método descrito por Nizetic *et al.* (128). Brevemente:

- 1) La membrana se colocó sobre papel Whatman 1MM saturado con solución desnaturalizante (NaOH 0,5 M, NaCl 1,5 M) y se incubó durante 4 min a temperatura ambiente, y a continuación se incubó 4 min más en la misma solución a 80 °C.
- 2) A continuación, se transfirió a otro papel Whatman 1MM saturado con solución neutralizante (Tris-HCl 1 M pH=7,4, NaCl 1,5 M) y se incubó durante 4 min a temperatura ambiente.

\*Una vez transferidas las colonias a la membrana, la placa de agar original se conservaba a 4 °C hasta la obtención de los resultados de la hibridación. En el caso de que alguna colonia mostrara señal positiva, ésta se recuperaba de la placa original para su confirmación.

- 3) Para eliminar al máximo los restos celulares, aún presentes en la membrana de nylon, se realizó un tratamiento con Proteinasa K (Merck, Darmstadt, Alemania) colocando la membrana sobre papel Whatman 1 MM saturado con solución de lisis (Tris-HCl 50 mM pH=8,5, EDTA 50 mM, NaCl 100 mM, Na-lauryl-sarcosina 1% p/v, Proteinasa K 250 µg/ml), durante 30 min a 37 °C.
- 4) Posteriormente se dejó secar la membrana. A continuación se colocó entre papel de plástico transparente y se irradió con luz UV (4 min en la cara de las células y 2 min en el reverso).
- 5) Para terminar de eliminar los restos celulares se realizaron 2 lavados de 45 min a 68 °C en solución SSC 3X, SDS 0,1% la composición de la cual está descrita en el apartado de Materiales y Métodos generales (Anexo III) y, a continuación, se colocó la membrana entre 2 hojas de papel Whatman 1 MM y se realizó una ligera presión para la eliminación de los restos celulares.
- 6) La membrana fue prehibridada con solución estándar (Roche Diagnostics, Manheim, Alemania) durante 4 h a 68 °C y hibridada con 10 ml de una solución de sonda conteniendo una concentración de sonda de 25 ng/ml, durante toda la noche a 65 °C, en agitación en un horno de hibridación.
- 7) Posteriormente, se realizaron 2 lavados de 45 min con SSC 5X, SDS 0,1% a 65 °C y dos lavados más de 30 min con SSC 2X, SDS 0,1% a temperatura ambiente.
- 8) La detección se realizó utilizando un kit de detección de digoxigenina luminiscente (Roche Diagnostics, Manheim, Alemania) y los resultados se visualizaron en placas de fotografía, siguiendo el protocolo estándar descrito en el Anexo III).

### **1.2.5.2. Valoración de la especificidad de la sonda**

Se valoró la especificidad de tres sondas para la detección del gen *stx*<sub>2</sub>. De las tres sondas analizadas, una tenía 26 pb y era de síntesis comercial (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) y estaba marcada con digoxigenina (120), y las otras dos, se sintetizaron mediante PCR y marcaje con Dig-11-dUTPs (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) de 169 y 378 pb (122), respectivamente. Para su síntesis se utilizaron los cebadores internos y externos, descritos anteriormente, y ADN del bacteriófago 933W (EMBL X07865), portador del gen *stx*<sub>2</sub>, como molde.

Una primera valoración de la especificidad de las sondas se realizó mediante la comparación de la secuencia de la sonda con las secuencias depositadas en las librerías genómicas GenBank y EMBL (European Molecular Biology Library) utilizando el programa BLAST, disponible en la página web: <http://www.ncbi.nlm.nih.com> (Wisconsin Package Version 10.2, Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisconsin, Estados Unidos).

Además, se valoró la especificidad de las tres sondas, experimentalmente, frente a los controles descritos anteriormente.

Se escogió la sonda de 378 pb por presentar mayor especificidad y sensibilidad con los controles para los siguientes experimentos.

### **1.2.5.3. Determinación del límite de detección del método**

El límite de detección del método de la hibridación colonial se determinó mediante la siembra en placa de diferentes concentraciones de las cepas utilizadas como control negativo y positivo, y la realización de la correspondiente hibridación. Las concentraciones probadas fueron 10<sup>4</sup> -10<sup>3</sup> UFC/ml de la cepa control negativo respecto a 1-10 UFC/ml de la cepa control positivo.

#### **1.2.5.4. Aislamiento de cepas portadoras del gen *stx*<sub>2</sub> en muestras ambientales**

Una vez puesta a punto la técnica de la hibridación colonial se procedió al aislamiento de cepas portadoras del gen *stx*<sub>2</sub> en las muestras de agua residual urbana, animal y en heces de bovinos. Para ello se realizaron diluciones decimales seriadas de las muestras y se sembraron 250 µl de la correspondiente dilución en placas de 14 cm de diámetro de agar Chromocult® para coliformes (Merck, Darmstadt, Alemania) y se incubaron a 37 °C durante 24 h. Para la hibridación colonial se escogieron aquellas placas que presentaban una elevada carga microbiana y, en el caso de aquellas muestras en las que la enumeración de cepas *stx*<sub>2</sub> por el NMP y PCR anidada había mostrado una concentración de éstas muy baja, con proporciones inferiores a 1/1000 respecto a los coliformes totales, se hibridaron un mínimo de 10 membranas por muestra para elevar las posibilidades de encontrar algún positivo.

El motivo de la elección del agar Chromocult fue que permitía la recuperación de los coliformes totales y no realizaba una selección para ningún serotipo de los descritos dentro del grupo STEC. Además, permitía valorar la distribución del gen *stx*<sub>2</sub> en otras especies pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*, además de *E. coli*, como *Enterobacter* y *Citrobacter*, en los que se ha descrito la presencia de este gen. El objetivo era, pues, observar la distribución del gen *stx*<sub>2</sub> dentro los miembros de la familia *Enterobacteriaceae*.

#### **1.2.5.5. Comprobación de las colonias hibridadas positivamente**

Todas las colonias que mostraron señal positiva en la hibridación colonial fueron aisladas en cultivo puro en agar TSA. Se comprobó la presencia del gen *stx*<sub>2</sub> mediante la PCR descrita anteriormente, utilizando el menor número de resiembras posibles para evitar perder el bacteriófago portador del gen *stx*<sub>2</sub>, lo cual ha sido previamente descrito (78, 145). Las colonias positivas para la hibridación y PCR fueron congeladas a -70 °C en presencia de glicerol al 15% (v/v) para un posterior estudio de las mismas.

### 1.2.6. Enumeración y aislamiento de cepas de *E. coli* O157

El método utilizado para la enumeración y el aislamiento de cepas de *E. coli* O157 fue descrito por Bonjoch (28) (v. Anexo III). Brevemente, el método consistió en la recuperación de las células que pudieran estar dañadas (mediante la incubación de las muestras en agua peptonada suplementada con antibióticos), la aplicación de la técnica de la separación inmunomagnética utilizando microesferas paramagnéticas unidas a un anticuerpo que reconoce el antígeno O157 (217) con pequeñas modificaciones, la siembra en agar CT-SMAC (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) y la detección inmunológica del antígeno O157, mediante una inmunodetección colonial. A diferencia del método que tradicionalmente se utiliza para la recuperación de *E. coli* O157 en muestras de alimentos y clínicas (en las que se realiza un enriquecimiento previo de 6 h), el tiempo de incubación fue reducido a 1 h y 30 min, intervalo de tiempo en el que no se detectaron variaciones del número de bacterias presentes en la muestra inicial y que permitía, de esta manera, cuantificar el número de bacterias en las muestras originales. Otra de las diferencias fue la utilización de un mayor número de lavados y de volúmenes mayores de solución de lavado al aplicar la técnica de la separación inmunomagnética. El proceso seguido se indica detalladamente en el apartado de Materiales y Métodos generales (v. Anexo III).

Aquellas colonias que presentaron reacción positiva fueron aisladas en cultivo puro y congeladas a -70 °C en presencia de glicerol al 15% (v/v), para posteriores estudios. La confirmación de la presencia del antígeno O157 se realizó mediante PCR utilizando los cebadores que amplifican una región del gen *rfb*<sub>O157</sub> que codifica para la síntesis del antígeno O157 (206):

RfbE-a 5'- CTACAGGTGAAGGTGGAATGG-3'

RfbE-b 5'-ATTCCTCTCTTTCCTCTGCGG-3'

Las condiciones de PCR fueron las siguientes:

A) Desnaturalización: 8 min a 95 °C

B) Amplificación durante 30 ciclos:

Desnaturalización: 0,5 min a 95 °C

Unión de los cebadores "annealing": 0,5 min a 58 °C

Elongación: 0,5 min a 72 °C

C) Elongación final: 7 min a 72 °C

D) Conservación de la muestra: tiempo indefinido a 4 °C

Paralelamente, se comprobó la expresión del antígeno O157 mediante la utilización de un kit comercial específico para la detección de *E. coli* O157, el O157<sup>®</sup> Detection Kit (Merck, Darmstadt, Alemania) y la extracción del lipopolisacárido (LPS) y posterior detección inmunológica del antígeno O157 ( v. Anexo III).

La extracción del lipopolisacárido LPS se realizó utilizando el método de la proteinasa K (67), descrito en el apartado de Materiales y Métodos generales (Anexo III). A continuación, 10 µl de la muestra fueron sometidos por duplicado a electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (96) en una solución formada por 25 mM Tris, 192 mM Glicina y 0,1% SDS utilizando un Mini-Protean II Dual Slab Cell (Bio-Rad, Richmond, USA). Uno de los geles fue teñido con nitrato de plata (195) de acuerdo con el protocolo indicado en el apartado de Materiales y Métodos generales (Anexo III) y el otro fue utilizado para la detección del antígeno O157. Para ello, el segundo gel fue electrotransferido utilizando un Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad, Richmond, USA) a membranas de nitrocelulosa (Hybond ECL, Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England) utilizando una solución formada por 25 mM Tris, 192 mM Glicina y 20% de Metanol. El gel fue sometido a 150 V durante 1 h siguiendo las instrucciones del fabricante y, a continuación, se siguió el protocolo de la inmunodetección del antígeno O157 tal como se indica en el apartado de Materiales y Métodos generales (Anexo III).



### 1.3- Resultados

#### 1.3.1. Enumeración de indicadores bacterianos en las muestras de agua residual y heces de bovinos

Las muestras de agua residual urbana mostraron valores muy constantes y similares para los diferentes indicadores bacterianos analizados, en las diferentes EDAR analizadas, durante el tiempo que se realizó el estudio. Los valores se situaron alrededor de  $10^6$  UFC/ml, para los coliformes totales y de  $10^5$  UFC/ml, para *E. coli* y coliformes fecales. La relación entre los diferentes indicadores se mantuvo, aunque con pequeñas variaciones, en todas las EDAR estudiadas. En la siguiente tabla (**Tabla 1.1**) se muestran las diferentes medias obtenidas con su correspondiente desviación estándar.

**Tabla 1.1** - Enumeración de los indicadores bacterianos de contaminación fecal en muestras de agua residual urbana.

Origen	N	CT $\log_{10}$ (UFC +1)/ml	CF $\log_{10}$ (UFC+ 1)/ml	EC $\log_{10}$ (UFC+1/ml)
<b>EDAR 1</b>	33	6,1 (0,2)	5,4 (0,3)	5,1 (0,2)
<b>EDAR 2</b>	7	5,9 (0,1)	5,3 (0,2)	4,9 (0,1)
<b>EDAR 3</b>	13	5,8 (0,3)	5,3 (0,2)	5,1 (0,3)
<b>EDAR 4</b>	2	6,2 (0,1)	5,1 (0,1)	4,8 (0,2)
<b>EDAR 5</b>	3	5,5 (0,2)	4,7 (0,1)	4,6 (0,1)

Los números indican el promedio de los diferentes indicadores bacterianos. Entre paréntesis se muestra la desviación estándar. **N**, número de muestras analizadas; **CT**, coliformes totales; **CF**, coliformes fecales; **EC**, *E. coli*.

En el caso de las muestras de agua residual animal procedente de mataderos y de heces de ganado bovino se obtuvieron diferencias en función del matadero analizado. Así pues en el agua residual procedente de matadero porcino se obtuvo una media de  $10^6$  UFC/ml de todos los indicadores analizados mientras que, tanto en el agua residual de matadero bovino como en las heces, se obtuvo una media cercana a  $10^5$  UFC/ml, sin observar diferencias en cuanto al tipo de indicador analizado. En el agua residual del matadero mixto, donde se sacrificaban varias especies animales, se obtuvo una relación similar a la del ganado vacuno. No obstante, la relación entre los diferentes indicadores en muestras de origen animal fue de aproximadamente 1:1:1. La **Tabla 1.2.** muestra los diferentes valores obtenidos en el agua residual procedente de matadero.

**Tabla 1.2** - Enumeración de indicadores bacterianos de contaminación fecal en muestras de agua residual de matadero y heces de bovinos.

Origen	N	CT	CF	EC
		$\log_{10}$ (UFC+1)/ml	$\log_{10}$ (UFC+1)/ml	$\log_{10}$ (UFC+1/ml)
<b>Matadero Porcino</b>	4	6,2 (0,2)	6,0 (0,3)	6,0 (0,2)
<b>Matadero Bovino</b>	8	4,7 (0,5)	4,7 (0,5)	4,6 (0,5)
<b>Matadero Mixto</b>	3	5,3 (0,2)	5,1 (0,2)	5,1 (0,1)
<b>Heces Bovino</b>	3	4,7 (0,2)	ND	4,6 (0,3)

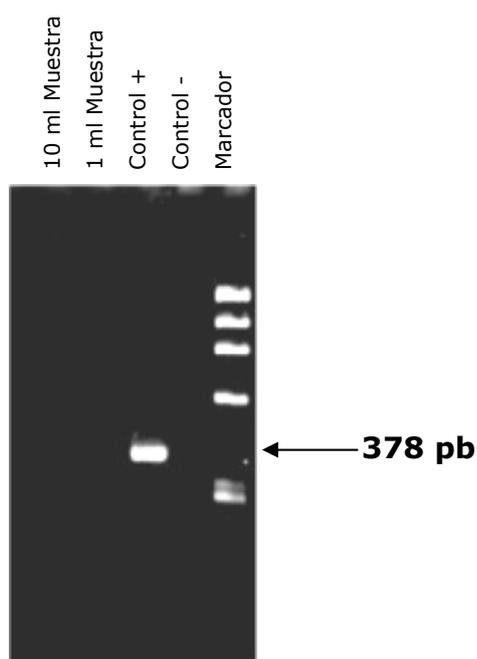
Los números indican el promedio de los diferentes indicadores bacterianos. Entre paréntesis se muestra la desviación estándar. **N**, número de muestras analizadas; **CT**, coliformes totales; **CF**, coliformes fecales; **EC**, *E. coli*; **ND**, dato no disponible.

### 1.3.2. Cuantificación de cepas portadoras del gen *stx*<sub>2</sub>

#### 1.3.2.1. Detección del gen *stx*<sub>2</sub>: amplificación de un fragmento del gen mediante la técnica de la PCR simple

Si bien se obtuvo señal de amplificación en los controles positivos utilizados descritos en el apartado de Materiales y Métodos, el gen *stx*<sub>2</sub> no pudo ser detectado mediante PCR simple en las muestras de agua residual analizadas. Se consideró negativa la reacción de PCR cuando no fue posible la visualización de la banda correspondiente al fragmento de 378 pb al analizar 5  $\mu$ l de la reacción de PCR en un gel de agarosa al 2% (**Figura 1.2**)

**Fig. 1.2** - Detección del gen *stx*<sub>2</sub> mediante PCR en las muestras de agua residual.



Como se puede apreciar en la imagen, no se obtuvo amplificación del fragmento de 378 pb en ninguna de las dos muestras analizadas, correspondientes a la extracción de ADN de un volumen de 10 ml y 1 ml de muestra de la EDAR 1. Como control positivo se utilizó ADN de la cepa 43889 y como control negativo H<sub>2</sub>O. El marcador de peso molecular utilizado fue PhiX174.

### **1.3.2.2. Análisis del límite de detección de la PCR atendiendo al método de extracción de ADN utilizado**

El método de extracción de ADN basado en la utilización de la matriz InstaGene permitió detectar hasta un total de  $10^6$  UFC/ml de la muestra original.

Sin embargo, la utilización del otro método clásico basado en la utilización de un detergente, permitió detectar hasta un mínimo de  $10^5$  UFC/ml de la muestra original. Este método fue el escogido para la enumeración de las bacterias porque, además de resultar más sencillo y económico, permitía una mayor recuperación de ADN.

El paso de centrifugación de la muestra ( $250 \times g$  durante 15 min), previo a la extracción del ADN, con el fin de reducir el número de partículas interferentes en la realización de la PCR, no redujo los valores obtenidos en la enumeración de los indicadores bacterianos, por lo que se aplicó en todas las muestras analizadas mediante PCR.

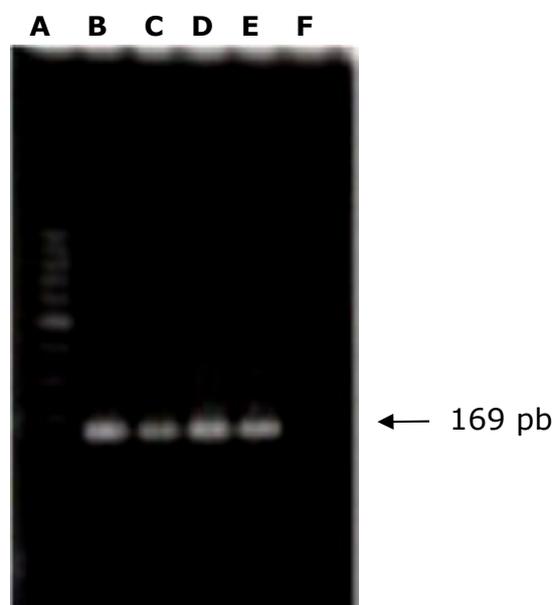
Atendiendo a la sensibilidad del método de PCR, se esperaba obtener señal de amplificación positiva siempre que el número de cepas portadoras del gen *stx*<sub>2</sub> estuviera por encima de  $10^4$  UFC/ml, sin tener en consideración la presencia de inhibidores, tema que será tratado en la Discusión de este capítulo, al concentrar un volumen de 10 ml de la muestra en 1 ml.

### **1.3.2.3. Aumento de sensibilidad de la PCR: PCR anidada**

Con el fin de aumentar la sensibilidad de la PCR se planteó utilizar la técnica de la PCR anidada para la detección del gen *stx*<sub>2</sub> (120). Esta técnica permitió detectar el gen *stx*<sub>2</sub> en las muestras de agua residual utilizando volúmenes de 10 ml y 1 ml de agua residual para la extracción del ADN, por lo que basándose en los resultados obtenidos anteriormente mediante la PCR simple, el gen estaba presente aunque a una concentración inferior a  $10^4$  UFC/ml (asumiendo una sola copia del gen en cada bacteria). Posteriormente, con la determinación del límite de detección de la PCR anidada en este tipo de muestras fue posible realizar la estimación del número de genes *stx*<sub>2</sub>.

En la **Figura 1.3** se pueden observar algunas de las muestras que resultaron positivas para la presencia del gen *stx*<sub>2</sub> mediante PCR anidada.

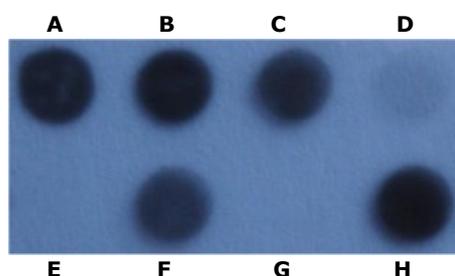
**Fig. 1.3.** Detección del fragmento de 169 pb del gen *stx*<sub>2</sub> mediante PCR anidada



A, Marcador de peso molecular; B, C y D, muestras que amplificaron mediante la PCR anidada; E y F, controles positivo (cepa ATCC 43889) y negativo, respectivamente.

La identidad del amplímero obtenido fue comprobada inicialmente mediante hibridación ADN-ADN, utilizando la sonda de 26 pb marcada con digoxigenina descrita en el apartado de Materiales y Métodos generales (Anexo III). Los resultados de esta hibridación se muestran en la **Figura 1.4**.

**Fig. 1.4.** Comprobación de la identidad del amplímero mediante Dot Blot



**A, B, C y F**, muestras en las que se detectó el fragmento de 169 pb mediante PCR anidada y que después hibridaron con la sonda de 26 pb; **D y E**, muestras en las que no se detectó amplificación mediante la PCR anidada; **G y H**, controles negativo y positivo de la PCR anidada, respectivamente.

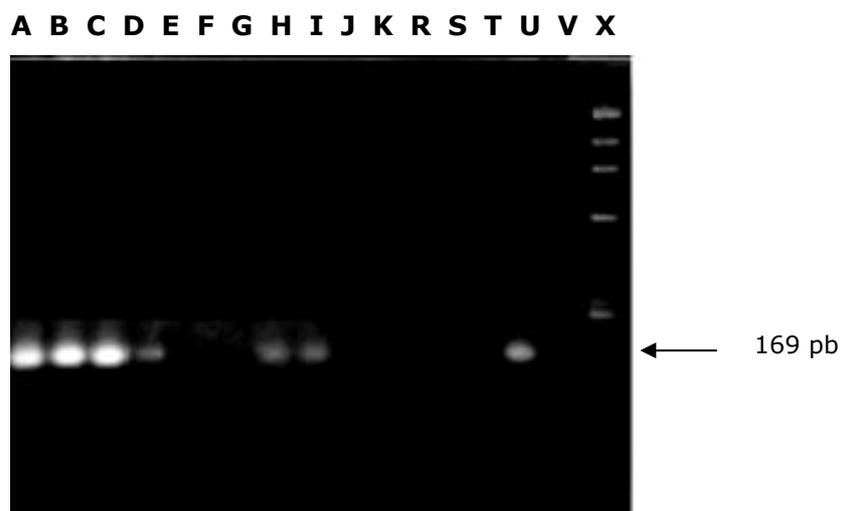
Además de esta hibridación, se realizó una secuenciación de uno de los fragmentos obtenidos. Este fragmento mostró una homología del 100% con la secuencia del gen *stx*<sub>2</sub> correspondiente codificada por el bacteriófago 933W depositada en el banco de datos genético con el código EMBL X07865.

#### **1.3.2.4. Determinación del límite de detección de la PCR anidada**

Como paso previo a la enumeración de cepas portadoras del gen *stx*<sub>2</sub> se estableció experimentalmente el límite de detección de la técnica de la PCR para las muestras de agua residual. Si bien se observaron ciertos efectos inhibitorios, tanto de las bacterias presentes en el agua residual (agua autoclavada), como de las sustancias inhibitorias (agua filtrada e inoculada experimentalmente con la cepa control negativo), se optó por valorar el límite de detección procediendo a la enumeración de un cultivo del control positivo con una concentración conocida, tal como se describe en el apartado de Materiales y Métodos, en una muestra de agua residual que previamente había dado negativa para la presencia del gen *stx*<sub>2</sub>.

En agua residual autoclavada y filtrada se observó una inhibición de la PCR en las dos últimas diluciones decimales realizadas, respecto a las mismas diluciones realizadas en Ringer 1/4 tal, como se muestra en la **Figura 1.5**.

El resultado obtenido de la enumeración de la cepa control en el agua residual, a la que no se le había realizado ningún tratamiento, sugirió que eran necesarias alrededor de 30 bacterias por reacción de PCR anidada para poder detectar una banda en el gel de agarosa.

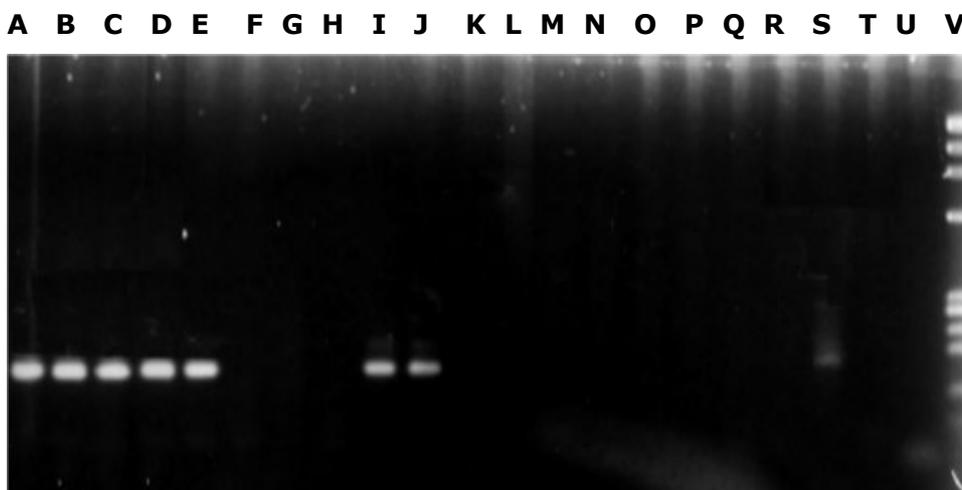
**Fig. 1.5-** Inhibición de la PCR en el agua residual

Inhibición de la PCR anidada en agua residual (carriles **H** a **S**) respecto a las mismas diluciones realizadas en R1/4 (carriles **A** a **G**); **U** y **V**, controles positivo y negativo, respectivamente; **X**, marcador de peso molecular, PhiX174

#### **1.3.2.5. Estimación del número de bacterias portadoras del gen *stx*<sub>2</sub> en muestras de agua residual mediante PCR anidada**

Se obtuvieron valores positivos en varios volúmenes de muestra analizados, desde 10 ml hasta incluso 0,01 ml, dependiendo de la muestra. Se decidió realizar 5 réplicas de 1 ml, 0,1 ml y 0,01 ml, respectivamente para proceder a la evaluación de las muestras. En la **Figura 1.6** se muestra el resultado obtenido al realizar la PCR anidada de las diferentes réplicas y diluciones. Los resultados obtenidos en las diferentes muestras después de realizar los cálculos del NMP teniendo en consideración el número de bandas positivas obtenidas en cada una de las réplicas y diluciones se muestran en las **Tablas 1.3 y 1.4**.

**Fig. 1.6** - Detección del gen *stx*<sub>2</sub> mediante la combinación de la técnica del NMP y PCR anidada en una de las muestras de agua residual analizadas



**A, B, C, D y E**, réplicas de 1 ml; **F, G, H, I y J**, réplicas de 0,1 ml; **K, L, M, N y O**, réplicas de 0,01 ml; **P, Q y R**, controles negativos de extracción de ADN; **S**, control positivo (cepa ATCC 43889); **T y U** controles negativos de PCR y PCR anidada, respectivamente; **V**, marcador de peso molecular (PhiX174).

Los números estimados a partir de esta técnica oscilaron entre 10, en el caso de agua residual urbana, y  $10^3$  (NMP+1/ml), en el caso del agua de matadero porcino y bovino. Se observó una relación entre el número de cepas *stx*<sub>2</sub> y el grupo de los coliformes fecales (y *E. coli*) del orden de  $1:10^3$ , respectivamente en las aguas residuales urbanas, y en las aguas de matadero porcino y mixto. Sin embargo, en las aguas residuales de matadero bovino, se observó una relación del orden de  $1:10^2$ . Los motivos que podrían contribuir a estas diferencias se comentan en el apartado de Discusión del capítulo.

Si bien se observó una amplia desviación estándar (0,8) en las muestras de matadero bovino en cuanto al número de bacterias *stx*<sub>2</sub> estimado, una desviación similar (0,5) se observó también en la enumeración de los indicadores bacterianos (**Tabla 1.2**). Sin embargo, para cada muestra individual se mantuvieron las proporciones indicadas anteriormente de  $1:10^2$ . Esta elevada desviación pudo estar asociada a irregularidades en el caudal de salida del agua residual o a una variación de la concentración de contaminantes microbianos como consecuencia de variaciones en las prácticas en los mataderos, como se discutirá en el apartado correspondiente.

Hay que destacar que en todas las muestras de agua residual analizadas se obtuvieron positivos mediante la PCR anidada en alguno de los volúmenes analizados. No obstante en las 3 muestras de heces analizadas se observó inhibición de la PCR, por lo que el número de bacterias portadoras del gen *stx*<sub>2</sub> no pudo ser estimado utilizando el mismo sistema de extracción de ADN. Dado que era un número reducido de muestras no se tuvieron en consideración.

**Tabla 1.3** - Estimación del número de bacterias portadoras del gen *stx*<sub>2</sub> en las muestras de agua residual urbanas y porcentaje de muestras positivas analizadas.

Origen	N	Bacterias <i>stx</i> <sub>2</sub> $\log_{10}$ (NMP+1)/ml	Detección (%)
<b>EDAR 1</b>	31	1,6 (0,3)	100%
<b>EDAR 2</b>	7	1,9 (0,4)	100%
<b>EDAR 3</b>	13	2,0 (0,4)	100%
<b>EDAR 4</b>	2	2,3 (0,5)	100%
<b>EDAR 5</b>	3	1,2 (0,2)	100%

N, número de muestras; Entre paréntesis, desviación estándar.

**Tabla 1.4** - Estimación de bacterias portadoras del gen *stx*<sub>2</sub> en las muestras de agua residual de matadero y porcentaje de muestras positivas analizadas.

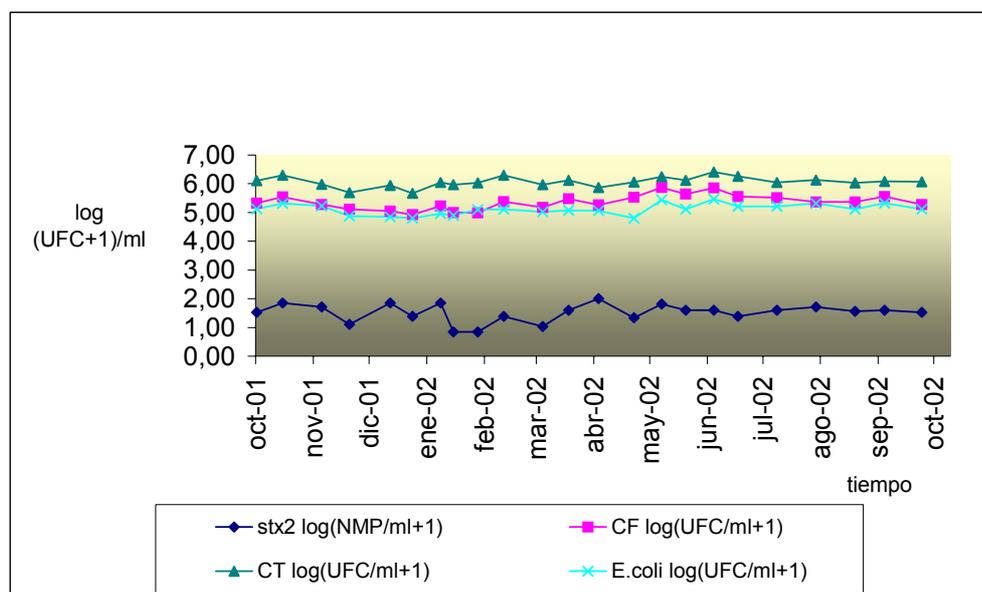
Origen	N	Bacterias <i>stx</i> <sub>2</sub> log <sub>10</sub> (NMP+1)/ml	Detección (%)
<b>Matadero Porcino</b>	4	3,1 (0,5)	100%
<b>Matadero Bovino</b>	8	2,8 (0,8)	100%
<b>Matadero Mixto</b>	3	2,1 (0,3)	100%

N, número de muestras; Entre paréntesis, desviación estándar.

#### **1.3.2.6. Variación estacional del número de bacterias portadoras del gen *stx*<sub>2</sub> en el agua residual urbana**

Con el fin de estudiar posibles variaciones estacionales en el número de bacterias portadoras del gen *stx*<sub>2</sub> se realizó el seguimiento de éstas durante un año en el agua bruta de la EDAR 1, de origen urbano.

Los valores obtenidos para los indicadores bacterianos y bacterias portadoras del gen *stx*<sub>2</sub> fueron similares a lo largo del año. La **Figura 1.7** muestra la evolución de estos valores en el periodo analizado. Si bien se observan algunas pequeñas diferencias, principalmente en la primavera, no resultaron significativas según el test ANOVA realizado ( $p > 0,05$ ).

**Fig. 1.7** - Variación anual del gen *stx*<sub>2</sub> en agua residual urbana

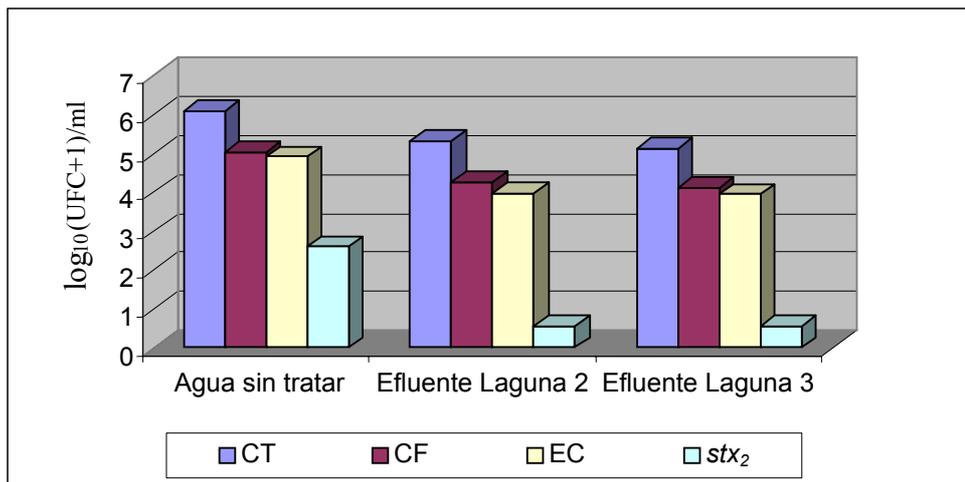
**CT**, coliformes totales; **CF**, coliformes fecales; **EC**, *E. coli*; **stx**<sub>2</sub>, cepas portadoras del gen *stx*<sub>2</sub>

### **1.3.2.7. Reducción de bacterias portadoras del gen *stx*<sub>2</sub> con relación a los indicadores de contaminación fecal analizados en el tratamiento del agua residual realizado en la EDAR 4 y 5**

Se observó una reducción de todos los indicadores bacterianos analizadas en el agua tratada de las dos EDAR analizadas, así como también del número estimado de bacterias portadoras del gen *stx*<sub>2</sub>. Sin embargo, se observaron diferencias entre la EDAR 4, en la que se utiliza el sistema de lagunaje (4 lagunas), para el tratamiento del agua residual, y la EDAR 5, en la que se realiza un tratamiento secundario mediante lodos activados, seguido de un tratamiento terciario mediante lagunaje (1 laguna). En la EDAR 4 (**Figura 1.8**) se observó una reducción de 2 unidades logarítmicas de bacterias *stx*<sub>2</sub>, mientras que los indicadores bacterianos se redujeron en 1 unidad logarítmica, en el efluente de la tercera laguna. En la EDAR 5 (**Figura 1.9**), los valores de coliformes totales, coliformes fecales y *E. coli* se redujeron entre 3,5 y 4,5 unidades logarítmicas. La reducción de bacterias *stx*<sub>2</sub> fue superior a 1 unidad logarítmica. No obstante, no pudieron compararse los resultados, ya que éstas no fueron detectadas en el

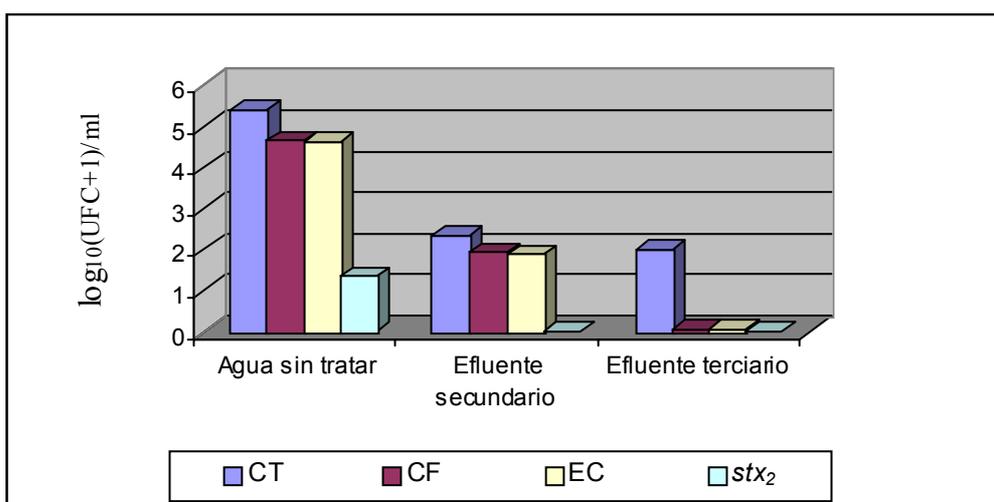
efluente del tratamiento terciario. Por tanto, fue imposible estimar su eliminación en esta EDAR. Los valores de reducción obtenidos se muestran en la **Tabla 1.5**.

**Fig. 1.8** - Efectos del proceso de tratamiento del agua residual en los valores de los indicadores bacterianos y bacterias portadoras del gen *stx*<sub>2</sub> en la EDAR 4.



**CT**, Coliformes totales; **CF**, Coliformes fecales; **EC**, *E. coli*; **stx**<sub>2</sub>, bacterias portadoras del gen *stx*<sub>2</sub> expresado como el log<sub>10</sub> (NMP+1)/ml; **UFC**, unidades formadoras de colonia

**Fig. 1.9** - Efectos del proceso de tratamiento del agua residual en los valores de los indicadores bacterianos y bacterias portadoras del gen *stx*<sub>2</sub> en la EDAR 5.



**CT**, Coliformes totales; **CF**, Coliformes fecales; **EC**, *E. coli*; **stx**<sub>2</sub>, bacterias portadoras del gen *stx*<sub>2</sub> expresado como el log<sub>10</sub> (NMP+1)/ml; **UFC**, unidades formadoras de colonia

**Tabla 1.5** - Reducciones logarítmicas de las diferentes poblaciones bacterianas estudiadas en los diferentes tratamientos

Origen	CT	CF	EC	Bacterias <i>stx</i> <sub>2</sub>
	log <sub>10</sub>	log <sub>10</sub>	log <sub>10</sub>	log <sub>10</sub>
	(UFC+1)/ml	(UFC+1)/ml	(UFC+1)/ml	(NMP+1)/ml
<b>EDAR 4</b>				
<b>EL2</b>	0,8	0,8	0,9	2,0
<b>EL3</b>	0,2	0,2	0,0	0,0
<b>EDAR 5</b>				
<b>ES</b>	3,0	2,8	2,7	>1,1
<b>ET</b>	0,4	1,8	1,8	>1,1

**NT**, agua no tratada; **ES**, efluente secundario; **ET**, efluente terciario; **EL2**, efluente en la salida de la laguna 2; **EL3**, efluente en la salida de la laguna 3; **EC**, *E. coli*; **TC**, coliformes totales; **CF**, coliformes fecales; **UFC**, unidades formadores de colonia; **NMP**, número más probable; \*, valor calculado en función del límite de detección del método.

### 1.3.3. Desarrollo de una metodología para el aislamiento de cepas portadoras del gen *stx*<sub>2</sub>, basada en la técnica de la hibridación colonial

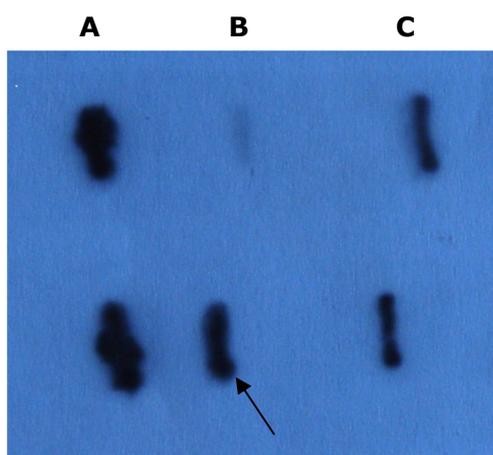
#### 1.3.3.1. Valoración de la especificidad de la sonda

Como se ha indicado anteriormente en el apartado de Materiales y Métodos, se valoró la especificidad de 3 sondas diferentes debido a la falta de especificidad que se encontró en las primeras hibridaciones frente a las cepas control.

La primera de las sondas testadas fue la sonda de 26 pb utilizada anteriormente para la comprobación de los resultados positivos obtenidos mediante la PCR. Si bien esta sonda reconocía la cepa ATCC 43889 utilizada como control positivo, uno de los controles negativos, la cepa ATCC 43888, también mostraba señal positiva en la hibridación colonial, aunque con menor intensidad. No obstante, el resto de controles negativos, *E. coli* C600, CN13 y DH5 $\alpha$ , no mostraron señal en la hibridación.

La utilización de las sondas de 169 y 378 pb, sintetizadas mediante PCR, con la incorporación de dig-dUTPs durante la reacción, permitió reducir esta inespecificidad. Sin embargo, se encontraron diferencias en cuanto a la especificidad de la sonda en función del ADN molde utilizado en la reacción de PCR para el marcaje de la sonda. Así pues, cuando se utilizó el ADN extraído de la cepa 43889 (control positivo) como molde, se observaron reacciones inespecíficas en la hibridación al utilizar la cepa 43888 como control negativo. Esta inespecificidad se eliminó al utilizar como molde el ADN purificado a partir del bacteriófago 933W, inducido a partir de la cepa de *E. coli* C600 (933W) (118). En la figura siguiente se muestran los resultados obtenidos, al utilizar la sonda de 378 pb.

**Fig. 1.10** - Valoración de la especificidad de la sonda de 378 pb en función del ADN molde utilizado para su síntesis



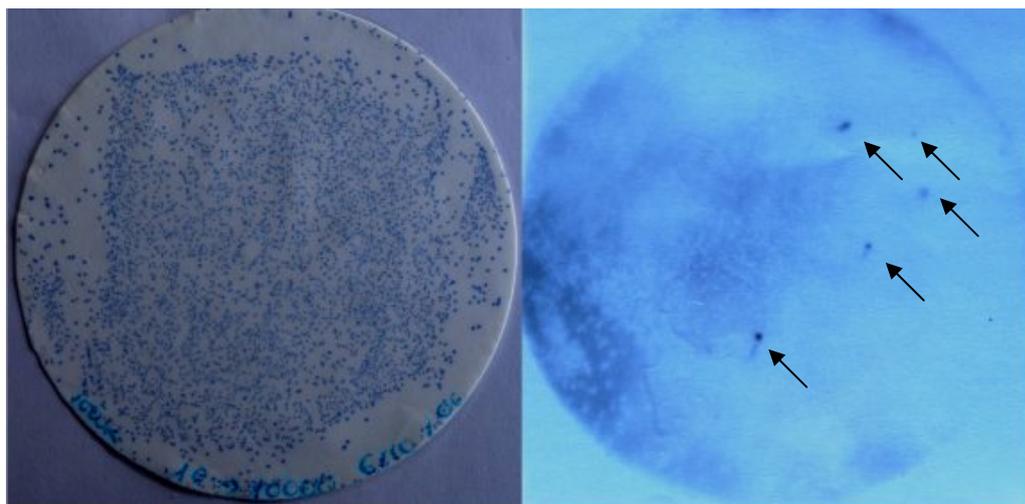
En la imagen se observan los resultados obtenidos tras la hibridación de las cepas **A** (ATCC 43889, portadora del gen *stx*<sub>2</sub>), **B** (ATCC 43888, no portadora del gen *stx*<sub>2</sub>) y **C**, (cepa lisogénica para el bacteriófago 933W portador del gen *stx*<sub>2</sub>) utilizando la sonda sintetizada a partir del ADN del bacteriófago 933W (parte superior), o a partir del ADN de la cepa ATCC 43889 (parte inferior). Tal como muestra la flecha, la cepa B (control negativo), mostró señal de inespecificidad al utilizar la sonda sintetizada utilizando como ADN bacteriano como molde.

Finalmente, se optó por la utilización de la sonda de 378 pb sintetizada a partir de ADN del bacteriófago 933W, por presentar una mayor intensidad en la señal del control positivo que las otras dos sondas ensayadas y por su especificidad frente a los controles utilizados.

### 1.3.3.2. Determinación del límite de detección del método

El método de la hibridación colonial permitió detectar 1 colonia positiva entre un máximo de aproximadamente  $10^3$  colonias negativas, utilizando como controles positivo y negativo las cepas ATCC 43889 y ATCC 11303, respectivamente. La comprobación de que los resultados obtenidos mediante la hibridación correspondían con la cepa 43889, se realizó visualmente, ya que estas cepas crecen con una coloración diferente en el medio Chromocult, como se ha indicado en el apartado de Materiales y Métodos. La **Figura 1.11** muestra los resultados obtenidos en estos ensayos de determinación de sensibilidad.

**Fig. 1.11** - Estudio del límite de detección de la sonda de 378 pb frente a un cultivo mixto de cepas *stx*<sub>2</sub> versus cepas no portadoras del gen *stx*<sub>2</sub>.



Detección de cepas portadoras del gen *stx*<sub>2</sub> en condiciones experimentales. Las flechas señalan la detección de éstas cepas en un cultivo mixto con una relación aproximada de 1:1000 respecto a cepas no portadoras.

El límite de detección observado se encontró dentro del rango de los valores obtenidos en la enumeración de cepas *stx*<sub>2</sub> y coliformes totales. Así pues, el número de cepas *stx*<sub>2</sub> en relación con el número de coliformes totales capaces de crecer en las placas de agar Chromocult fue de aproximadamente  $1:10^3$ , respectivamente, en las aguas residuales urbanas, y de matadero porcino y mixto, por lo que se esperaba poder detectar y aislar cepas *stx*<sub>2</sub> en las placas. En el caso del agua residual de matadero bovino, esta proporción fue mayor,  $1:10^2$ , por lo que las probabilidades de éxito eran aún mayores.

### **1.3.3.3. Aislamiento de cepas $stx_2$ de las aguas residuales y heces de bovinos**

Se consiguieron aislar un total de 144 cepas  $stx_2$  de las diferentes muestras de agua residual. La distribución de estas cepas, en función del origen de la muestra, fue la siguiente: 66 cepas de agua residual urbana, 55 de agua residual de bovinos (47 de matadero y 8 de heces), 6 de matadero de cerdos y 17 de origen mixto.

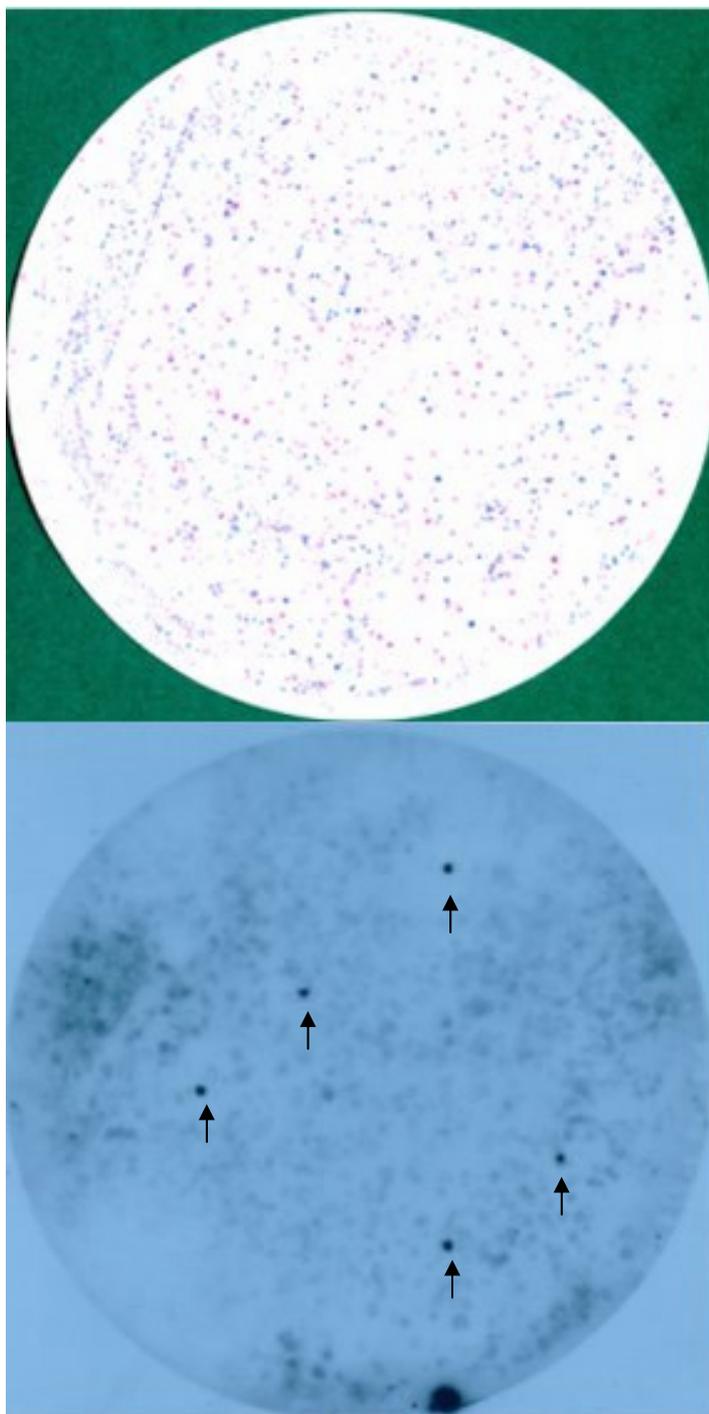
Las muestras en las que más fácilmente se detectaron y aislaron cepas  $stx_2$  tenían como origen agua residual de matadero bovino, tal como era predecible de los estudios anteriores por las proporciones de los diferentes indicadores observadas. Aunque se consiguieron aislar cepas procedentes de muestras de las EDAR urbanas, se necesitaron un mínimo de 10 membranas, cada una de ellas con alrededor de 1000 colonias, para conseguir detectar alguna colonia positiva en alguna de las muestras. Excepcionalmente, 48 de las 66 cepas aisladas de agua residual urbana fueron aisladas de una sola muestra aunque, como se tratará en el Capítulo 2, resultaron tener un origen clonal.

No se obtuvieron resultados positivos de todas las muestras analizadas puesto que, en muchas ocasiones, la elevada carga microbiana respecto a los coliformes totales en el agua residual urbana, dificultaba su aislamiento. La **Figura 1.12** muestra las diferencias en cuanto al aislamiento de cepas  $stx_2$  en diferentes aguas residuales. El hecho de que los coliformes totales presentaron una unidad logarítmica superior en las muestras de agua residual urbana respecto al resto de muestras, fue un factor clave en las posibilidades de éxito.

No obstante, la relación entre el número de cepas  $stx_2$  estimado mediante la técnica del NMP y el número de indicadores bacterianos analizado, se correspondió en buena medida con los resultados obtenidos con la hibridación. Así pues, se detectaron aproximadamente 1 colonia positiva en placas que contenían alrededor de 100 colonias de coliformes fecales crecidas en la placa de Chromocult, en las muestras de matadero bovino. En el resto de muestras también se observó la relación estimada mediante el NMP y PCR anidada.

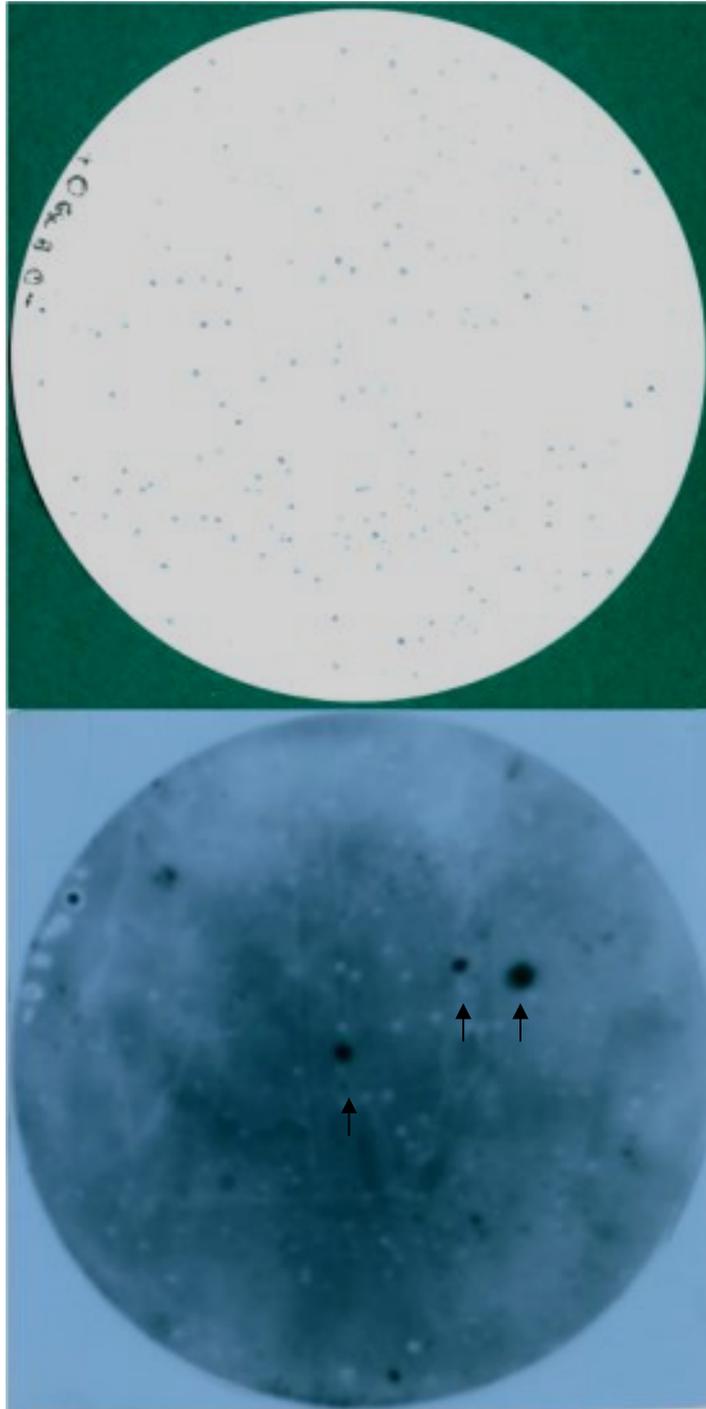
La caracterización de las cepas aisladas será el objetivo del Capítulo 2, mientras que la caracterización de los bacteriófagos presentes en su interior será tratada en el Capítulo 3.

**Fig. 1.12** - Cepas *stx*<sub>2</sub> detectadas en diferentes muestras de agua residual  
a) Ejemplo de detección en agua residual de matadero porcino



Las flechas indican emisión de señal positiva tras la hibridación de la membrana (figura superior).

## b) Ejemplo de una muestra de agua residual de matadero



Las flechas indican emisión de señal positiva tras la hibridación de la membrana (figura superior).

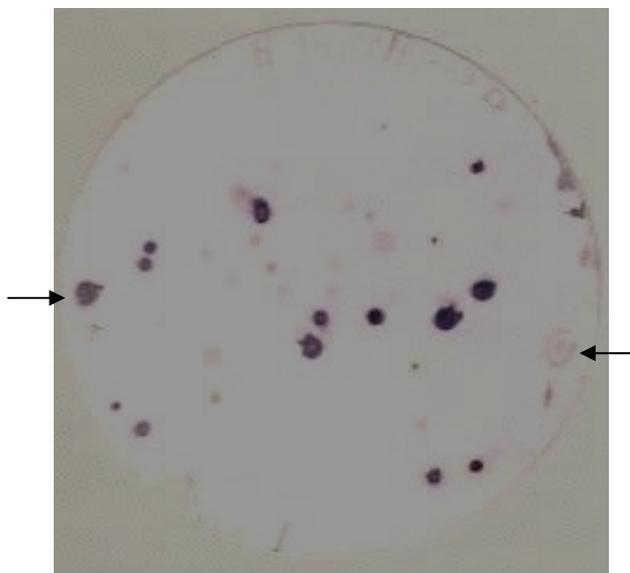
### **1.3.4. Enumeración y aislamiento de cepas de *E. coli* O157 en las aguas residuales**

#### **1.3.4.1. Estimación del número de cepas O157**

Se realizó una estimación del número de bacterias *E. coli* O157 presentes en algunas de las muestras anteriormente estudiadas, utilizando la técnica de la separación inmunomagnética, la siembra en el medio selectivo CT-SMAC y la detección inmunológica del antígeno O157. Como representante del agua residual urbana se escogió la EDAR 1, mientras que como representante de agua residual de ganado bovino y porcino, se escogieron el matadero bovino y porcino, respectivamente.

Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 1.6**. Si bien los resultados cuantitativos no son significativos por el reducido número de muestras y las desviaciones estándar tan elevadas, sí que se observó presencia de este serotipo en las muestras analizadas, por ello se habla de estimación. La elevada desviación estándar fue debida a que en alguna de las muestras no se consiguieron obtener resultados positivos. En función de estos resultados, el serogrupo O157 se encontró en una concentración media que osciló entre 1,5 y 10 UFC/ml, obteniéndose la mayor concentración en aguas residuales de matadero bovino. La relación entre el serogrupo O157 y las bacterias portadoras del gen *stx<sub>2</sub>* y los coliformes fecales fue del orden de  $1:10^2$  y  $1:10^5$  en el agua residual urbana, respectivamente. En el agua residual de matadero bovino y porcino esta relación fue del orden de  $1:10^2$  y  $1:10^4$  y de  $1:10^3$  y  $1:10^6$ , respectivamente.

La **Figura 1.13** muestra un resultado típico de inmunodetección colonial en el que se observan algunas colonias positivas.

**Fig.1.13** - Inmunodetección colonial del serotipo O157

Las flechas de la izquierda y derecha señalan los controles positivo y negativo, respectivamente. Para la realización de estos controles se tomó una colonia de un cultivo reciente de cada uno de ellos y se depositó sobre la membrana de nitrocelulosa una vez realizada la transferencia de las colonias crecidas en el agar CT-SMAC a la correspondiente membrana.

Este estudio se vio limitado, en el caso de las muestras procedentes de la EDAR 1, por el elevado número de cepas capaces de crecer en el agar CT-SMAC incluso después de la separación inmunomagnética, aunque se consiguieron aislar algunas cepas O157 positivas, como se muestra en la **Tabla 1.7**.

**Tabla 1.6** - Estimación del promedio de cepas de *E. coli* O157 por ml en aguas residuales de diferentes orígenes

Origen	N	IMS + CT-SMAC	Inmuno- detección O157
EDAR 1	8	>2,7	0.2 (0,2)
Matadero bovino	4	1,7 (0,6)	1.0 (0,7)
Matadero porcino	2	0,8 (0.2)	0,4 (0,4)

**IMS + CT-SMAC**, recuento de colonias después de realizar la separación inmunomagnética y la siembra en agar CT-SMAC; **Inmunodetección O157**, número de colonias que mostraron señal positiva después de la detección inmunológica del antígeno O157 mediante la inmunodetección colonial. Los resultados se expresan en  $\log_{10}$  (UFC/ml); **N**, número de muestras. Se muestra la desviación estándar entre paréntesis.

#### 1.3.4.2. Aislamiento de cepas O157

Las presuntas cepas O157 detectadas mediante la detección inmunológica del antígeno O157 utilizando la técnica de la inmunodetección colonial, fueron aisladas de la placa original de CT-SMAC y fueron confirmadas mediante la detección de los genes que codifican el antígeno O157 mediante la técnica de la PCR. En la **Tabla 1.7** se muestran los resultados obtenidos tras la realización de esta confirmación. Se obtuvo un menor porcentaje de falsos resultados positivos en el caso del agua residual de matadero, hecho que será comentado en el apartado correspondiente de Discusión.

**Tabla 1.7** - Confirmación de las diferentes cepas de *E. coli* O157 presuntivas

Origen	Presuntos <i>E. coli</i> O157	Confirmados <i>E. coli</i> O157	% confirmación
<b>EDAR 1</b>	9	3	33%
<b>Matadero bovino</b>	54	45	83%
<b>Matadero porcino</b>	4	4	100%

La expresión del gen que codifica para el antígeno O157 fue comprobada utilizando el kit comercial descrito en el apartado de Materiales y Métodos, y la extracción del LPS seguida de la detección inmunológica del antígeno O157. Todas las cepas que resultaron positivas en la PCR mostraron reacción positiva con los dos procedimientos de detección del antígeno.

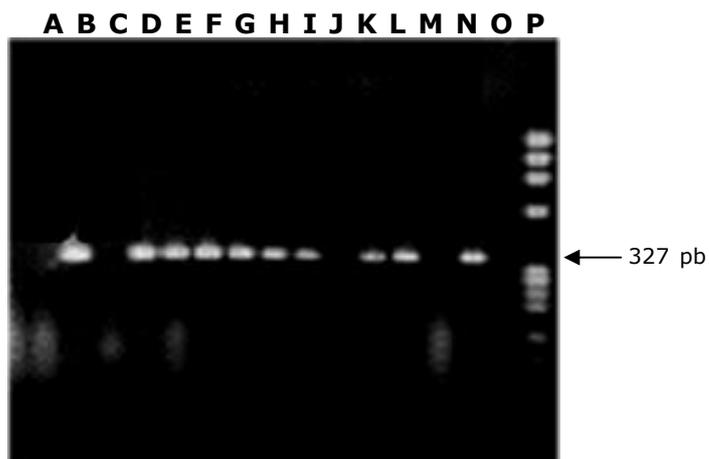
En la **Figura 1.14** se muestra un ejemplo de los resultados obtenidos en la confirmación de estas cepas.

Además de las 52 cepas aisladas y confirmadas como O157 que se muestran en la **Tabla 1.7**, se aislaron 20 cepas más de agua residual de matadero bovino, que fueron incorporadas en el estudio.

Así pues, un total de 72 cepas O157 aisladas mediante separación inmunomagnética, siembra en CT-SMAC y detección inmunológica y 144 cepas portadoras del gen *stx*<sub>2</sub> aisladas mediante la hibridación colonial específica para el gen *stx*<sub>2</sub> serán caracterizadas en el Capítulo 2.

**Fig. 1.14.** Confirmación de *E. coli* O157 mediante: a) Detección del gen codificante para el antígeno O157 (*rfb*<sub>O157</sub>), b) Utilización de un kit comercial para la detección de este serogrupo y c) Extracción del lipopolisacárido (LPS) y detección inmunológica del antígeno O157

a)



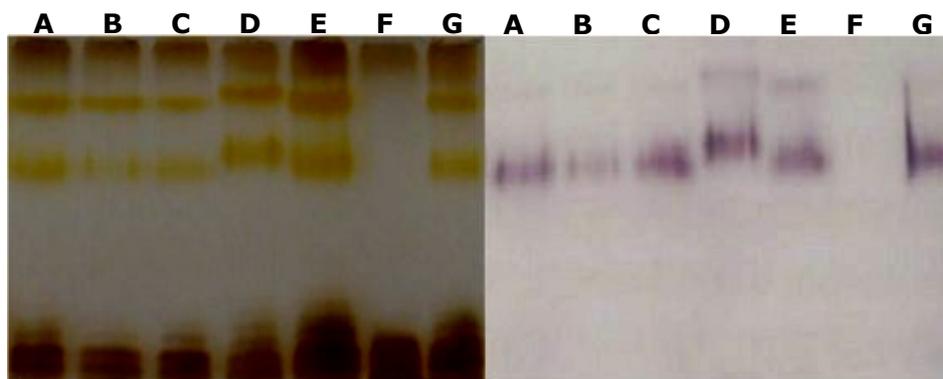
**A, C, J y M**, cepas no portadoras del gen *rfb*<sub>O157</sub>; **B, D, E, F, G, H, I, K y L**, cepas portadoras del gen *rfb*<sub>O157</sub>; **N y O**, controles positivo y negativo, respectivamente; **P**, Marcador de peso molecular PhiX174

b)



Confirmación de la presencia del antígeno O157 mediante un kit comercial. **C**, control del funcionamiento del kit; **T**, detección del antígeno O157

c)



Patrón del LPS teñido con nitrato de plata (izquierda) y tras la detección inmunológica del antígeno O157 (derecha). **A, B, C, D y E**, detección del antígeno O157; **F y G**, controles negativo y positivo, respectivamente.



## 1.4 - Discusión

Desde que *E. coli* O157:H7 fue aislada por primera vez del agua en 1989 (111), han tenido lugar varios brotes asociados al consumo de agua potable contaminada, así como también a la ingestión accidental de aguas recreativas (189, 135, 83). Diversos estudios han mostrado que estas bacterias, al igual que muchas otras, son capaces de sobrevivir en estos ambientes entrando en un estado en el que estas bacterias se mantienen viables pero no son capaces de crecer en los medios de cultivo clásicos (207). Esta capacidad de supervivencia unido a la baja dosis infecciosa de estas bacterias hacen que estos ambientes representen potenciales reservorios de estas cepas.

Además, según algunos estudios, estas cepas también presentan una elevada supervivencia en heces de ganado bovino (51, 205), por lo que las heces, además de constituir una posible fuente de reinfección para el ganado podrían favorecer la dispersión de estos patógenos en el medio ambiente, debido a las prácticas habituales de abonar los campos con las heces de estos animales, y entrar en la cadena alimentaria mediante la ingestión de vegetales contaminados. A ello hay que añadir que, cada vez más, se tiende a la reutilización de aguas residuales parcialmente tratadas no sólo en la agricultura, sino también en parques y jardines, e incluso como aporte de agua en determinadas industrias.

Entre los serotipos de *E. coli* que pertenecen al grupo STEC, el serotipo O157:H7 ha sido el que ha recibido mayor atención debido a su especial virulencia que se ve reflejada por el número tan elevado de afectados en cada uno de los brotes (130). Esto ha contribuido a su estudio y al desarrollo de diversos métodos de detección y aislamiento, fundamentalmente en muestras clínicas y alimentarias. La mayoría de ellos se basan en la detección de dos características bioquímicas diferenciales del resto de serotipos de *E. coli*, como son la ausencia de actividad  $\beta$ -D-glucuronidasa y la no-fermentación del sorbitol en 24 h, mientras que algunos otros se basan en la identificación del serotipo mediante técnicas inmunológicas.

No obstante, el elevado número de serotipos STEC que en la actualidad han sido asociados, tanto a casos esporádicos como a brotes de colitis hemorrágica y/o de síndrome urémico hemolítico, ponen en evidencia la necesidad de detectar todos estos serotipos STEC. La principal dificultad de detección de estas cepas radica en la ausencia de una característica diferencial del resto de bacterias, a parte de su capacidad de producir Stxs. Por ello la mayoría de métodos desarrollados se basan en la detección de estas toxinas o en los genes que codifican para ellas.

Además, la dificultad de detección de estas cepas en ambientes acuáticos se ve incrementada en gran medida por la elevada carga microbiana que presentan las aguas en comparación con el bajo número de cepas STEC que éstas presentan.

Hasta el momento se han realizado pocos estudios sobre la prevalencia de cepas STEC en ambientes acuáticos. En un estudio realizado por Martins *et al.* (1992), en el que analizaron la presencia de genes de patogenicidad en cepas de *E. coli* aisladas de agua residual sin tratar y agua tratada mediante la técnica de la hibridación colonial, se consiguieron aislar 3 cepas que presentaban secuencias homólogas al gen *stx*<sub>2</sub> de un total de 212 cepas analizadas en el agua tratada (110), mientras que en el agua sin tratar no obtuvieron ningún aislamiento positivo.

Recientemente, la PCR cuantitativa ha sido propuesta para la enumeración de estas bacterias (179, 103), pero el límite de detección situado alrededor de 10<sup>3</sup> UFC/ml, limita su uso para aquellas muestras en las que hay una concentración menor y además no es posible concentrar las muestras por la presencia de inhibidores de la PCR, como es el caso de las aguas residuales.

En este estudio se ha desarrollado un método adecuado para la enumeración de las cepas STEC portadoras del gen *stx*<sub>2</sub> en aguas residuales, tanto de origen urbano como animal, basado en la combinación de la técnica de la PCR anidada con la técnica del NMP, sin realizar una selección para un serotipo STEC concreto.

El método utilizado permitió la detección de alrededor de 30 genes *stx*<sub>2</sub> (NMP) por ml de muestra. Si bien los resultados presentados son una estimación del número de bacterias portadoras del gen *stx*<sub>2</sub> los valores obtenidos reflejan una prevalencia más o menos constante de estas bacterias en las regiones de Catalunya estudiadas, tanto en agua residual urbana, como en agua residual de origen animal, detectándose en el 100% de las muestras. Asimismo, la relación entre las bacterias portadoras del gen *stx*<sub>2</sub> y los valores de los indicadores microbianos analizados también fueron constantes a lo largo del periodo analizado, en las diferentes muestras. Así pues, se observó una relación de aproximadamente 1:1000 bacterias *stx*<sub>2</sub> respecto a los coliformes fecales y/o *E. coli*, respectivamente, en todas las muestras analizadas con la excepción de las muestras de agua residual de matadero bovino en los que la proporción aumentó hasta 1:100. El motivo de la mayor proporción observada en las muestras de origen bovino podría estar relacionado con el hecho de que los rumiantes han sido considerados como uno de los reservorios principales de las cepas STEC (63).

A diferencia de lo que ocurre en el caso de *E. coli* O157:H7, observándose una estacionalidad en la excreción de estas bacterias por los animales así como también en la frecuencia de brotes (63), en el caso de las bacterias portadoras del gen *stx*<sub>2</sub> no se observaron diferencias estacionales en el agua residual urbana, de acuerdo con los resultados obtenidos tras la monitorización de la EDAR 1 durante el año en el que se realizó el estudio. Estos resultados corroboran estudios previos realizados en aguas fluviales de una área muy industrializada de Japón, en los que se obtuvieron unos valores de entre 10<sup>2</sup> y 10<sup>4</sup> bacterias *stx*<sub>2</sub> por ml independientemente de la estación (95). La elevada diversidad de serotipos que podrían ser portadores del gen *stx*<sub>2</sub> (tal como se discutirá en el Capítulo 2), podría explicar estas diferencias, ya que la técnica de la PCR utilizada es capaz de detectar cualquier bacteria que haya incorporado el gen *stx*<sub>2</sub>. Únicamente se observó un ligero descenso en dos muestras tomadas durante el invierno, pero estas diferencias no fueron estadísticamente significativas.

Así pues, estos ambientes tendrían que ser considerados como potenciales reservorios (aunque el reservorio bovino es el principal reservorio descrito hasta el momento).

En cuanto a la reducción de las bacterias *stx*<sub>2</sub> en los diferentes tratamientos de agua residual estudiados, tratamiento mediante lagunaje (EDAR 4) y lodos activados y lagunaje (EDAR 5), se observó una reducción tanto de las bacterias *stx*<sub>2</sub> como del resto de indicadores bacterianos, sugiriendo que estas bacterias no son especialmente resistentes a estos tratamientos. Los valores de reducción para los coliformes fecales en el caso de la EDAR 4, en los que únicamente se observa un descenso de un logaritmo confirman estudios previos que, como en el caso de este estudio, fueron realizados durante el invierno (44).

Por otro lado, en cuanto al diseño de un método para la detección y el aislamiento de bacterias *stx*<sub>2</sub>, los resultados obtenidos en este estudio sugieren que el método de la hibridación colonial mediante la sonda de 378 pb de la subunidad A del gen *stx*<sub>2</sub> tiene una sensibilidad elevada para la detección de cepas STEC.

El hecho de que la utilización de ADN bacteriano de una cepa portadora del gen *stx*<sub>2</sub> para el marcaje de la sonda provocara la aparición de falsos positivos, podría haberse debido a alguna reacción inespecífica de los cebadores con el ADN bacteriano durante la reacción de marcaje de la sonda. Al utilizar ADN del bacteriófago 933W, portador del gen *stx*<sub>2</sub>, como molde no se detectaron falsos positivos.

La hibridación colonial resultó positiva en agua residual que contenía una concentración de cepas STEC en una relación de 1 UFC portadora del gen *stx*<sub>2</sub> entre aproximadamente 1000 UFC no portadoras del gen, lo que está en concordancia con los valores estimados de bacterias *stx*<sub>2</sub> mediante la técnica de la PCR anidada y NMP.

Mediante esta técnica, se consiguieron aislar un total de 144 cepas que hibridaban con el fragmento de 378 pb de la subunidad A del gen *stx*<sub>2</sub>. No obstante, un problema con el que nos encontramos en la realización del estudio

fue el de la elevada carga microbiana presente en el agua residual. La utilización de placas de agar de 140 mm en lugar de las que generalmente se utilizan (90 mm) permitió solventar en parte este problema, lo cual además permitió, el análisis de un mayor número de cepas en cada ensayo. Por otro lado, en aquellas muestras en las que la proporción de bacterias *stx*<sub>2</sub> respecto a los coliformes totales era superior a 1:1000, además de las placas de mayor diámetro, fue necesario la realización de varias réplicas de las placas con el fin de aumentar la posibilidad de obtener algún positivo en la hibridación.

Otra particularidad de este estudio es el uso de un agar no selectivo para ningún serotipo STEC en concreto, como es el agar Chromocult para coliformes y el crecimiento a 37 °C, que permitió analizar la presencia del gen *stx*<sub>2</sub> no sólo en cepas de *E. coli* O157 y no-O157 sino también en otros géneros pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*, como *Citrobacter* y *Enterobacter*, en los que la presencia de este gen ha sido previamente descrita (196, 141, 171).

Así pues, la detección de cepas STEC mediante la técnica de la hibridación colonial permite el aislamiento de cepas que poseen genes *stx* de cualquier serotipo. El principal problema radica en la necesidad de obtener colonias aisladas para su detección, con lo que en aquellas muestras en las que el número de cepas STEC es reducido con relación al total de cepas capaces de crecer en el medio, pueden haber problemas de interferencia por el resto de bacterias, cuando la proporción es a favor de estas.

Hay que remarcar que es posible que algunas de las cepas que poseen los genes estructurales para la producción de Stx no sean detectadas con los métodos estándares basados en la detección de la producción de toxina, ya que estos genes pueden perder la funcionalidad, como se discutirá en el Capítulo 2. El desarrollo de métodos basados en la detección de estos genes como el de la hibridación colonial posibilita, además de la detección y el aislamiento de estas bacterias, el estudio de la distribución de los genes *stx* entre las diferentes poblaciones bacterianas.

El método basado en la hibridación colonial constituye, pues, una herramienta útil para el estudio de la ecología del gen *stx*<sub>2</sub> en los ambientes

extraintestinales y para determinar el papel de las bacterias en el mantenimiento de este gen.

Estudios previos han demostrado la presencia de bacteriófagos portadores del gen *stx*<sub>2</sub> libres en aguas residuales (120, 123), por lo que los bacteriófagos atemperados presentes en estas cepas *stx*<sub>2</sub> presentes en estos ambientes podrían contribuir a su mantenimiento o dispersión. No obstante, el estudio de la presencia de bacteriófagos inducibles en las cepas aisladas será tratado en el Capítulo 3.

En cuanto a la presencia de cepas de *E. coli* O157 en las muestras de agua residual, éstas fueron detectadas en todas las muestras, independientemente del origen. No obstante, se encontraron diferencias en cuanto los valores observados en las muestras de agua residual de matadero, respecto a los otros dos orígenes, agua de matadero porcino y agua residual urbana, donde se obtuvieron los valores más elevados. Al igual que en el caso del gen *stx*<sub>2</sub>, podría estar relacionado con el papel del ganado bovino como uno de los reservorios principales (63).

Se han descrito pocos estudios en los que se haya intentado cuantificar *E. coli* O157 mediante la utilización de la separación inmunomagnética, sin efectuar un enriquecimiento previo. En un estudio realizado con muestras de heces de ganado vacuno (138), fue imposible recuperar las partículas de Dynabeads debido a las características físico-químicas de la muestra impidiendo, por tanto, la recuperación de *E. coli* O157:H7. En otro estudio realizado en América del Norte se observó que las vacas excretaban *E. coli* O157 en un rango que oscilaba entre 10<sup>2</sup>-10<sup>5</sup> UFC/g (223).

En este estudio, se ha conseguido detectar, aislar y cuantificar cepas de *E. coli* O157 sin necesidad de realizar un enriquecimiento previo, añadiendo un paso de recuperación de las células dañadas de 1h y 30 min, sin que haya crecimiento de las mismas. Posteriormente, mediante la incorporación de un sistema de detección inmunológico después de realizar una separación inmunomagnética y la siembra en agar CT-SMAC, permitió la diferenciación las cepas de *E. coli* O157 del resto de bacterias que crecen en el agar CT-SMAC con las mismas

características fenotípicas que éstas. Así mismo, este sistema permitió detectar todas las cepas de *E. coli* O157, tanto fermentadoras de sorbitol y con el enzima  $\beta$ -D-glucuronidasa (O157:H<sup>-</sup>), que han originado algunos brotes principalmente en países centroeuropeos (23), como las no fermentadoras de sorbitol con ausencia de actividad  $\beta$ -D-glucuronidasa (O157:H7 clásicas).

Fujisawa *et al.* obtuvieron resultados similares a los obtenidos en este estudio en cuanto al agua residual urbana, en los que el crecimiento de colonias similares al de *E. coli* O157 dificultaba el aislamiento de estas bacterias (50). Así mismo, Ehlers *et al.* (45) sólo consiguieron aislar un total de 2 cepas de *E. coli* O157 de un total de 88 colonias que mostraban el fenotipo típico de *E. coli* O157 en este medio. El número relativamente elevado de falsos positivos podría ser atribuido a la presencia de otras cepas que poseen un antígeno con estructura similar al descrito para *E. coli* O157 (29), tal como ha sido descrito en algunas cepas de *Citrobacter freundii* (17), y *Citrobacter sedlakii* (200) y *Citrobacter barrí* (87) . Además el LPS de *E. coli* O157 comparte epítomos con cepas de *Brucella abortus*, *Yersinia enterocolitica* O9, *Vibrio cholerae* O1 Inaba, *Salmonella* grupo N y *E. hermanii* (39, 181).

En este estudio, la confirmación de las colonias crecidas en el agar CT-SMAC después de la separación inmunomagnética, mediante la inmunodetección colonial, permitió reducir en buena medida el número de falsos positivos, obteniéndose en global un 78% de identificación positiva.

En consecuencia, la enumeración y el aislamiento de cepas de *E. coli* O157 no puede basarse exclusivamente en la utilización de métodos de separación inmunomagnética y la siembra en medios selectivos. La confirmación del serotipo mediante métodos inmunológicos específicos es necesaria para evitar el elevado número de falsos positivos.



## CAPÍTULO 2

---

*"Estudio de la diversidad de cepas bacterianas portadoras del gen  $stx_2$  y análisis de la variabilidad que presenta el gen"*



## **2.1- Introducción**

### **2.1.1. Sistemas de clasificación bacteriana**

La necesidad de separar las cepas patógenas de *E. coli* del resto de cepas comensales no patógenas ha hecho que se desarrollen sistemas de clasificación infraespecífica, de manera que se intentan correlacionar aquellas cepas patógenas con determinados perfiles, principalmente bioquímicos, serológicos o genéticos, obtenidos con diferentes técnicas de tipado, como son el biotipado, serotipado y genotipado, respectivamente.

#### **2.1.1.1. Biotipado bioquímico**

El biotipado bioquímico se basa en diferenciar las cepas en función de la capacidad de fermentar un determinado número de carbohidratos (como el manitol, la trealosa, la lactosa, la ramnosa o el sorbitol, entre otros) o de degradar determinados aminoácidos como la lisina, la ornitina o la arginina u otros compuestos que ponen de manifiesto la presencia de determinados enzimas como la  $\beta$ -D-glucuronidasa.

Relacionado con este tipo de clasificación en biotipos se han descrito numerosos sistemas automatizados que resultan rápidos y sencillos de realizar. Una variante de este sistema es la técnica de fenotipado bioquímico conocida como PhenePlate<sup>®</sup> System, que se basa en la clasificación de los diferentes aislamientos en función de la capacidad y cinética de degradación de los diferentes substratos analizados (94). En la **Figura 2.1** se pueden observar algunos detalles de dos de los métodos de tipado utilizados en el presente estudio, el API y el Phene Plate<sup>®</sup> System.

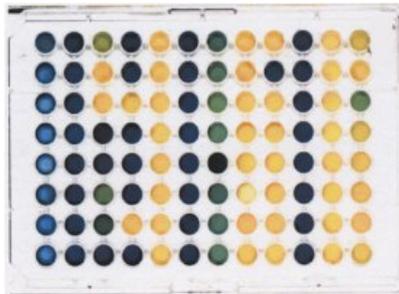
**Fig. 2.1-** Métodos de biotipado:

- a) Identificación mediante la galería API
- b) Tipado bioquímico mediante el sistema PhenePlate®

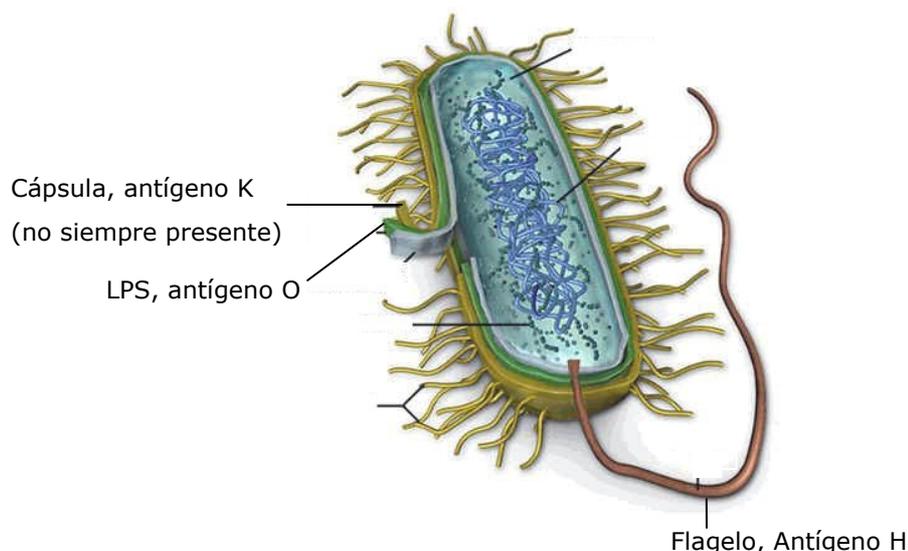
a)



b)

**2.1.1.2. Serotipado**

Otro de los sistemas más frecuentemente utilizados en la clasificación intraespecífica de *E. coli* (tipificación) es el serotipado, basado en el método descrito por Kauffmann (82), que se basa en la detección de tres antígenos celulares, el antígeno somático designado como antígeno O, que forma parte de la estructura del lipopolisacárido, el antígeno flagelar, designado como antígeno H, que forma parte del flagelo bacteriano de las cepas móviles, y el antígeno K, presente en aquellas bacterias que poseen cápsula. En la **Figura 2.2** se muestra un esquema de las diferentes estructuras antigénicas.

**Fig. 2.2** - Estructuras antigénicas bacterianas: LPS, flagelo, cápsula

Fuente: <http://www.microscopy.fsu.edu/cells/bacteriacell.html>

En la actualidad se han descrito un total de 181 antígenos O y 55 antígenos H, habiendo sido el último descrito el O181 y el H56 (el H50 fue eliminado por su similitud con el H10). No obstante, se continúan describiendo nuevos antígenos, que aún no han sido incorporados a esta nomenclatura. También se han descrito algunas cepas que no poseen antígeno O (o en las que el antígeno O no se ha sintetizado completamente), que aglutinan espontáneamente en una solución salina, las cuales son conocidas como cepas rugosas, y son denominadas OR.

La descripción de los 3 antígenos, O, H y K, proporciona información completa sobre el serotipo, aunque el antígeno K no suele determinarse en la mayoría de laboratorios por su dificultad. Sin embargo, teniendo en cuenta únicamente el antígeno O y H, este método permite diferenciar alrededor de 9500 serotipos diferentes.

Atendiendo a esta clasificación, han sido descritos alrededor de 400 serotipos STEC diferentes, aunque no todos han sido asociados a enfermedad en humanos o animales (16).

### **2.1.1.3. Genotipado**

Con la difusión de las técnicas moleculares en los laboratorios se han desarrollado nuevas técnicas como la electroforesis en campo pulsante (PFGE) de gran utilidad en estudios epidemiológicos, que permite comparar el ADN de los diferentes aislamientos después de haber sido cortado en fragmentos grandes por determinadas enzimas de restricción y ser sometido a una electroforesis en la que se va cambiando de dirección el campo eléctrico, de manera que se obtiene un patrón determinado en función del tamaño de los fragmentos obtenidos para cada aislamiento. Es una de las técnicas moleculares más útiles para establecer relaciones clonales entre diferentes cepas con el fin de determinar si brotes diferentes han sido causados por una misma cepa original y viceversa (46).

### **2.1.1.4. Fagotipado**

Otros sistemas de clasificación incluyen el fagotipado, consistente en la clasificación de una cepa en función de su susceptibilidad a un determinado número de bacteriófagos (3).

## **2.1.2. Características principales de las cepas STEC**

### **2.1.2.1. Factores de virulencia**

Entre los principales factores de virulencia implicados en patogénesis humana producidos por las cepas STEC hay que destacar la producción de una o varias toxinas shiga, la presencia de una región en el cromosoma bacteriano de 35 Kb conocida como LEE (*locus of enterocyte effacement*) que contiene diversos genes implicados en la formación de las lesiones típicas de adherencia y barrido de las microvellosidades, entre los cuales se encuentra el gen *eaeA*, que codifica una proteína de membrana externa, la intimina. A parte de estos factores se han descrito muchos otros genes que podrían contribuir a la virulencia de las diferentes cepas, aunque según se ha visto no hay un factor determinante. Los factores de virulencia más importantes se detallan a continuación.

### **2.1.2.1.1. Factores de virulencia codificados por bacteriófagos: las toxinas shiga**

Las toxinas *shiga-like* (Stx), conocidas también como verotoxinas, fueron descubiertas por Konowalchuk *et al.* en el año 1977 (93), cuando observaron que ciertas cepas de *E. coli* enteropatógenas pertenecientes a los serogrupos O18, O26, O68, O111 y O138, aisladas de pacientes con enteritis, producían una toxina diferente de la toxina termolábil (LT) y la termoestable (ST), y eran capaces de provocar una lesión intensa e irreversible sobre la línea celular Vero, una línea celular derivada de riñón del mono verde africano (*Cercopithecus aethiopicus*), por lo que fueron denominadas verotoxinas. Posteriormente, se vio que estas toxinas pertenecían a la misma familia que la toxina shiga producida por *Shigella dysenteriae* tipo I por lo que recibieron el nombre de toxinas tipo shiga (131). Dada la similitud que estas toxinas presentaban con la toxina shiga se propuso uniformar la nomenclatura, agrupándose dentro de la misma familia de toxinas shiga (Stx), en la que se reconocen diferentes variantes, como se indica a continuación (33)

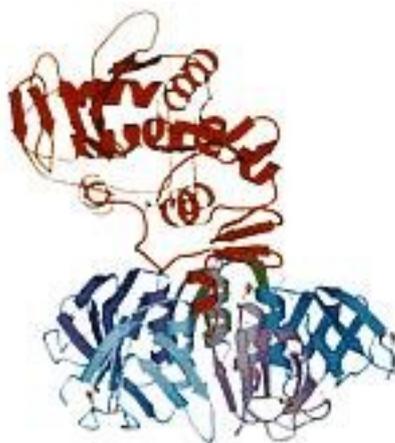
Existen dos grupos de Stxs, Stx<sub>1</sub> y Stx<sub>2</sub>, que difieren en cuanto a su secuencia aminoacídica y su reactividad inmunológica. El grupo de las Stx<sub>1</sub> es un grupo muy homogéneo que incluye el prototipo Stx<sub>1</sub>, la variante Stx<sub>1c</sub> y la toxina Shiga (Stx) producida por *Shigella dysenteriae* tipo I. Estas dos toxinas difieren únicamente en un único aminoácido y presentan la misma reacción inmunológica (114), por lo que se consideran prácticamente la misma toxina.

Por contra, el grupo de la Stx<sub>2</sub> es un grupo muy heterogéneo formado por el prototipo de toxina Stx<sub>2</sub> y cinco variantes principales Stx<sub>2</sub>, que han sido designadas como Stx<sub>2c</sub>, Stx<sub>2d</sub>, Stx<sub>2e</sub>, Stx<sub>2f</sub> y la recientemente descrita Stx<sub>2g</sub>, de entre un total de 11 subtipos reconocidos como tal (31). Todas ellas presentan entre ellas una elevada homología (114). En cambio, únicamente comparten alrededor de un 56% de la secuencia aminoacídica con la Stx<sub>1</sub>. Además de estas variantes, otras han sido detectadas mediante PCR, pero la gran mayoría no han sido aisladas ni secuenciadas (55, 140, 197).

Los dos grupos de toxinas comparten una serie de características, como son su estructura (formada por una subunidad A de 33 KDa y 5 subunidades B de 7,5 KDa) y el hecho de estar codificadas en bacteriófagos atemperados que se integran en el cromosoma bacteriano, tema que será tratado con más detalle en el siguiente capítulo.

Las cinco subunidades B se ensamblan para formar un pentámero que se unirá con el receptor eucariótico de la toxina, el globotriaosilceramida Gb<sub>3</sub> (Gal $\alpha$ 1-4 Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-1Cer) y el Gb<sub>4</sub> en el caso de la Stx<sub>2e</sub> (114). Esta estructura de toxina, formada por 1 pentámero que actúa de receptor y una subunidad catalítica, ha sido observada en otras toxinas como la toxina del cólera, la toxina lábil producida por las ETEC y la toxina pertúsica (174), aunque el modo de acción es muy diferente. Se cree que las toxinas inducen la síntesis de citoquinas como el TNF- $\alpha$  y la interleucina-1, que a su vez aumentan la expresión de los receptores Gb<sub>3</sub> y Gb<sub>4</sub> en las células endoteliales del glomérulo del riñón. Se ha visto que también son capaces de inducir apoptosis celular (41).

Así pues, una vez que la toxina es endocitada por la célula eucariota, la subunidad A se escinde en dos fragmentos, A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub>, de manera que el fragmento A<sub>1</sub> inactivará la subunidad 60S del ribosoma, interrumpiendo la síntesis de proteína y provocando, consecuentemente, la muerte celular. El fragmento A<sub>2</sub> actúa como puente de unión entre la subunidad A y el pentámero formado por las subunidades B. En referencia a las propiedades inmunológicas, la Stx<sub>1</sub> es neutralizada por anticuerpos anti-Stx y por anticuerpos anti-Stx<sub>1</sub>, aunque no es neutralizada por anticuerpos anti-Stx<sub>2</sub>. Del mismo modo, ni los anticuerpos anti-Stx<sub>1</sub> ni los anticuerpos anti-Stx neutralizan las diferentes variantes Stx<sub>2</sub>. En cambio, anticuerpos contra una de las variantes Stx<sub>2</sub> neutralizan en mayor o menor medida el resto de variantes Stx<sub>2</sub> (114).

**Fig. 2.3** - Modelo tridimensional de la toxina shiga

Fuente: <http://www.faculty.gvsu.edu>

La producción de toxina está asociada con la inducción de los bacteriófagos atemperados que codifican la toxina (49, 127). Asimismo, se ha observado que la producción de toxina se halla reprimida por altas concentraciones de hierro y por bajas temperaturas (112). Sin embargo, mientras algunos estudios indican que la transcripción del gen *stx*<sub>1</sub> se halla modulada por hierro (34), en el caso de la *stx*<sub>2</sub> no se ha observado esta regulación (118).

Estas toxinas están relacionadas directamente con las lesiones que aparecen en el síndrome urémico hemolítico, como el daño producido en las células endoteliales del riñón, aunque también se ha detectado algún caso aislado de cepas de *E. coli* O157:H7/H<sup>-</sup> aisladas de pacientes con HUS no productoras de Stxs (172).

#### **2.1.2.1.2. Factores de virulencia codificados por el cromosoma bacteriano: LEE e Intimina**

Como se ha indicado anteriormente, otro de los factores de virulencia importantes para la aparición de la colitis hemorrágica y el síndrome urémico hemolítico es la intimina, una proteína de membrana externa de 94 a 97 kDa, mediante la cual la bacteria se adhiere a la célula eucariota. Es responsable de la aparición de las lesiones de adherencia y borrado de las microvellosidades, no sólo en las cepas STEC, sino también en cepas EPEC, *Hafnia alvei*, *Citrobacter*

*rodentium*, y otras cepas similares a las EPEC que infectan perros, conejos, vacas y ratones (76). Se halla codificada en una región del cromosoma conocida con el nombre de LEE (*locus of enterocyte effacement*), una región del cromosoma bacteriano que, además de este factor de virulencia, contiene otros genes implicados en la adherencia y el borrado de las microvellosidades, como el gen *tir*, que codifica para el receptor de la intimina (147). Estos receptores son inyectados dentro de la célula eucariota mediante un sistema de secreción tipo III, gracias a unas proteínas codificadas también por el LEE en una agrupación de genes (de *sepA* a *sepI*). Además, estos genes también son responsables de la secreción de otras proteínas (EspA, EspB y EspD), implicadas en la transducción de señales necesarias para la formación de las lesiones indicadas anteriormente (146). Esta región del cromosoma tiene un tamaño de 43359 pb y un total de 41 genes en la cepa EDL933 del serotipo O157:H7 (147). Su bajo contenido en G+C (39,59%) en relación con el resto del cromosoma bacteriano y la presencia de secuencias repetitivas en los extremos de la secuencia reflejan una posible transferencia horizontal.

En cuanto a la proteína intimina, se han descrito diferentes variantes ( $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2,  $\beta$ 1,  $\beta$ 2,  $\gamma$ 1,  $\gamma$ 2/ $\theta$ ,  $\delta$ / $\kappa$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$ ,  $\eta$ ,  $\iota$ ,  $\lambda$ ,  $\mu$ ,  $\nu$ ,  $\xi$ ) (137, 184, 26, 75, 91, 24, 25). No obstante, se ha visto que la presencia de intimina no es imprescindible para el desarrollo de la enfermedad (146).

#### **2.1.2.1.3. Factores de virulencia plasmídicos: la enterohemolisina hemorrágica y otros**

Otro factor importante es una hemolisina que permitiría la utilización de la sangre liberada al intestino como fuente de hierro (98). Esta hemolisina, conocida como hemolisina enterohemorrágica, es diferente de la clásica hemolisina  $\alpha$  y se halla codificada por el gen *ehxA* localizado en un plásmido de 60 MDa (167), que poseen la mayoría de STEC, principalmente las pertenecientes al serotipo O157:H7. La presencia de esta hemolisina representa una ventaja selectiva respecto al resto de *E. coli* ya que les permitiría extraer el hierro de los glóbulos rojos y utilizarlo como fuente de hierro. El gen *ehxA* está codificado en un operón formado por los genes *ehxC*, *ehxA*, *ehxB* y *ehxD*, que están implicados en la síntesis y secreción de la proteína.

Además de esta hemolisina, el plásmido de 60 MDa también codifica una serin proteasa (EspP), que inhibe el factor V de coagulación, favoreciendo el sangrado. Estos genes se han encontrado en el 100% de las cepas de *E. coli* O157:H7 aislados de enfermos y en el 95% (20) y 36% (170) de los aislamientos de cepas STEC no O157 causantes de enfermedades. Otros genes codificados por este plásmido incluyen el *katP*, que codifica para una catalasa-peroxidasa y diversos genes implicados en el sistema de secreción tipo II como el *etp*.

Además, se ha sugerido que este plásmido podría codificar para fimbrias que podrían tener un papel importante en la colonización inicial del intestino (146).

Uno de los últimos factores implicados en la adherencia a las células descritos es una adhesina Saa, codificada por el gen *saa*. El gen *saa* fue identificado por Paton *et al.* (143) como uno de los potenciales factores de virulencia implicado en la adherencia de cepas STEC que no presentaban el locus LEE. Según estudios recientes está asociada a cepas presentes en el ganado vacuno y se podría estar codificada en el plásmido de 60 MDa de algunas STEC (143).

#### **2.1.2.1.4. Otros factores de virulencia**

Algunos de los serotipos más virulentos asociados a brotes humanos presentan una elevada resistencia a los ácidos (11), (113), lo cual hace posible que pasen la barrera gástrica e infecten al hombre. Según se ha visto, una dosis de 10 bacterias sería suficiente para causar una infección. Esta resistencia hace también posible que puedan persistir en determinados alimentos que hasta ahora se consideraban seguros por su bajo pH, así como también que puedan persistir en el tubo digestivo de los rumiantes, que constituye su principal reservorio. A esta resistencia contribuyen determinados genes como el gen *rpoS*, que codifica para el factor sigma, implicado en la regulación de genes importantes para la supervivencia de las células en fase estacionaria durante largos periodos de tiempo (146).

### **2.1.2.2. Resistencia a los antibióticos**

El uso indiscriminado de antibióticos tanto en el tratamiento de enfermedades humanas como en veterinaria ha provocado un aumento del número de bacterias que son resistentes a antibióticos en el medio ambiente. La mayoría de los residuos (que contienen antibióticos) son vertidos a los desagües y van a parar a ambientes acuáticos. De esta manera, las bacterias presentes en estos ambientes se ven expuestas a diferentes presiones selectivas favoreciendo el intercambio de genes de resistencia a antibióticos entre ellas a través los vectores de transmisión (plásmidos, los transposones y los bacteriófagos) (9).

El serotipo O157:H7 es, en general, sensible a la mayoría de antibióticos. Así pues, de un total de 125 cepas aisladas en humanos, alimentos y animales, el 24% eran resistentes a un antibiótico y el 19% eran resistentes a 3 o más antibióticos, siendo la estreptomicina y la tetraciclina los antibióticos a los que presentaban más resistencias (43).

### **2.1.3. Objetivos**

Los objetivos de este capítulo se han centrado en el estudio de la diversidad, a nivel fenotípico, incluyendo el serotipado, y genético, de las cepas STEC procedentes de los aislamientos descritos en el Capítulo 1.

En la mayoría de estudios realizados sobre diversidad de cepas STEC, se analizan cepas patógenas aisladas de brotes, o cepas aisladas de diversos orígenes utilizando medios selectivos para su detección. Sin embargo, las cepas STEC analizadas en este trabajo son un reflejo de lo que está ocurriendo en el medio ambiente, independientemente de su potencial como patógenos. Su importancia radica principalmente en este aspecto ya que estas cepas representan un reservorio de genes, que en un momento determinado, podrían contribuir a la emergencia de nuevas cepas patógenas, aunque hoy en día ellas no lo sean.

Así pues, los objetivos principales de este capítulo se resumen en los siguientes apartados:

- 1- Caracterización fenotípica (biotipado, serotipado, identificación a nivel de especie y análisis del espectro de resistencia a un determinado número de antibióticos.)
  
- 2- Caracterización genética de los principales factores de virulencia (estudio de las variantes de los genes *stx*, análisis de la producción de proteína Stx (*Stx*<sub>1</sub> y *Stx*<sub>2</sub>), y estudio de la presencia de los genes *eaeA*, *ehxA* y *saa*).



## 2.2 - Materiales y Métodos

### 2.2.1. Cepas bacterianas y materiales de cultivo utilizados

Las cepas bacterianas aisladas en el Capítulo 1, tanto las cepas portadoras del gen *stx<sub>2</sub>* aisladas mediante la técnica de la hibridación colonial, como las cepas aisladas mediante la separación inmunomagnética, siembra en CT-SMAC y detección inmunológica del antígeno O157, confirmadas como *E. coli* O157, fueron analizadas fenotípicamente y genéticamente utilizando las técnicas que se indican a continuación.

Estas cepas se conservaron en presencia de glicerol al 15% (v/v) a -70 °C durante todo el estudio. Para su análisis se utilizaron cultivos recientes (de 18 a 24 h) realizados en agar Luria Bertani (LB), crecidos a 37 °C.

Las cepas bacterianas utilizadas como controles positivos y negativos en cada uno de los ensayos realizados se resumen en la **Tabla 2.1**.

**Tabla 2.1-** Características de las cepas utilizadas como control en los diferentes ensayos

Cepa	Origen	Genotipo (respecto a factores de virulencia)	Ensayo en el que se utilizó como control
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	Colección Gibco-BRL <sup>(a)</sup>	No posee ninguno de los genes de virulencia analizados en este estudio	PhenePlate <sup>®</sup> System <sup>(+)</sup> , LPS <sup>(-)</sup> , actividad $\beta$ -D-glucuronidasa <sup>(+)</sup> , fermentación de sorbitol <sup>(+)</sup> , en todas las reacciones de PCR <sup>(-)</sup> , producción de Stx <sup>(-)</sup> , Southern <sup>(-)</sup>
<i>E. coli</i> C600 (933W)	Cepa de laboratorio <sup>(b)</sup>	<i>stx</i> <sub>2</sub>	PCR para detección del gen <i>stx</i> <sub>2</sub> <sup>(+)</sup> , Southern <sup>(+)</sup>
<i>E. coli</i> O91:H21 *	HUS <sup>(c)</sup>	<i>stx</i> <sub>2vha</sub> , <i>stx</i> <sub>2vhb</sub> ( <i>stx</i> <sub>2c</sub> )	PCR para detección del gen <i>stx</i> <sub>2c</sub> <sup>(+)</sup>
<i>E. coli</i> O174:H11 *	Muerte súbita infantil <sup>(c)</sup>	<i>stx</i> <sub>2d</sub>	PCR para detección del gen <i>stx</i> <sub>2d</sub> <sup>(+)</sup>
<i>E. coli</i> "FAC9" *	Enfermedad edematosa del cerdo <sup>(c)</sup>	<i>stx</i> <sub>2e</sub>	PCR para detección del gen <i>stx</i> <sub>2e</sub> <sup>(+)</sup>
<i>E. coli</i> ONT *	Palomas <sup>(d)</sup>	<i>stx</i> <sub>2f</sub>	PCR para detección del gen <i>stx</i> <sub>2f</sub> <sup>(+)</sup>
<i>E. coli</i> O157:H7 (ATCC43888)	Colección ATCC <sup>(e)</sup>	<i>eaeA</i> , <i>ehxA</i> , <i>rfb</i> <sub>O157</sub> , <i>fliC</i> <sub>H7</sub>	Producción de Stx <sub>1</sub> y Stx <sub>2</sub> <sup>(-)</sup>
<i>E. coli</i> O157:H7 (ATCC 43889)	Colección ATCC <sup>(f)</sup>	<i>stx</i> <sub>2</sub> , <i>eaeA</i> , <i>ehxA</i> , <i>rfb</i> <sub>O157</sub> , <i>fliC</i> <sub>H7</sub>	PCR detección genes <i>stx</i> <sub>2</sub> , <i>eaeA</i> , <i>ehxA</i> , <i>rfb</i> <sub>O157</sub> , <i>fliC</i> <sub>H7</sub> <sup>(+)</sup> , LPS (O157) <sup>(+)</sup> , $\beta$ -D-glucuronidasa <sup>(-)</sup> , fermentación de sorbitol <sup>(-)</sup> , producción Stx <sub>2</sub> <sup>(+)</sup>
<i>E. coli</i> O157:H7 (ATCC 43895)	Colección ATCC <sup>(g)</sup>	<i>stx</i> <sub>1</sub> , <i>stx</i> <sub>2</sub> , <i>eaeA</i> , <i>ehxA</i> , <i>rfb</i> <sub>O157</sub> , <i>fliC</i> <sub>H7</sub>	PCR <sup>(+)</sup> , LPS (O157) <sup>(+)</sup> , actividad $\beta$ - D-glucuronidasa <sup>(-)</sup> , producción de Stx <sub>1</sub> y Stx <sub>2</sub> <sup>(+)</sup>
<i>E. coli</i> O113:H21	Aislamiento de laboratorio <sup>(h)</sup>	<i>stx</i> <sub>2</sub> , <i>saa</i> , <i>ehxA</i>	PCR para detección del gen <i>saa</i> <sup>(+)</sup>

<sup>(a)</sup> (62); <sup>(b)</sup> (118); <sup>(c)</sup> (12); <sup>(d)</sup> (116); <sup>(e)</sup> Centre of Disease Control; <sup>(f)</sup> (108); <sup>(g)</sup> (212); <sup>(h)</sup> (73); <sup>(+)</sup> Control positivo; <sup>(-)</sup> Control negativo; \* Cepas cedidas por el Dr. J. Blanco (Laboratorio de Referencia de *E. coli*, Lugo, España)

### 2.2.2. Fenotipado bioquímico mediante el sistema PhenePlate®

Las cepas aisladas fueron caracterizadas fenotípicamente mediante el sistema PhenePlate® utilizando placas PhP-RE (PhP-Plate Microplates Technique AB, Suecia) diseñadas para el fenotipado bioquímico de los coliformes fecales. Consisten en microplacas de 96 pocillos (8 filas x 12 columnas) que contienen 11 medios deshidratados (cada uno distribuido en una columna) correspondientes a diferentes pruebas bioquímicas que son inoculadas tal como se esquematiza en la **Figura 2.4**. Los diferentes medios contienen celobiosa, lactosa, ramnosa, desoxirribosa, sacarosa, sorbosa, tagatosa, D-arabitol, meliobionato, galactona y ornitina.

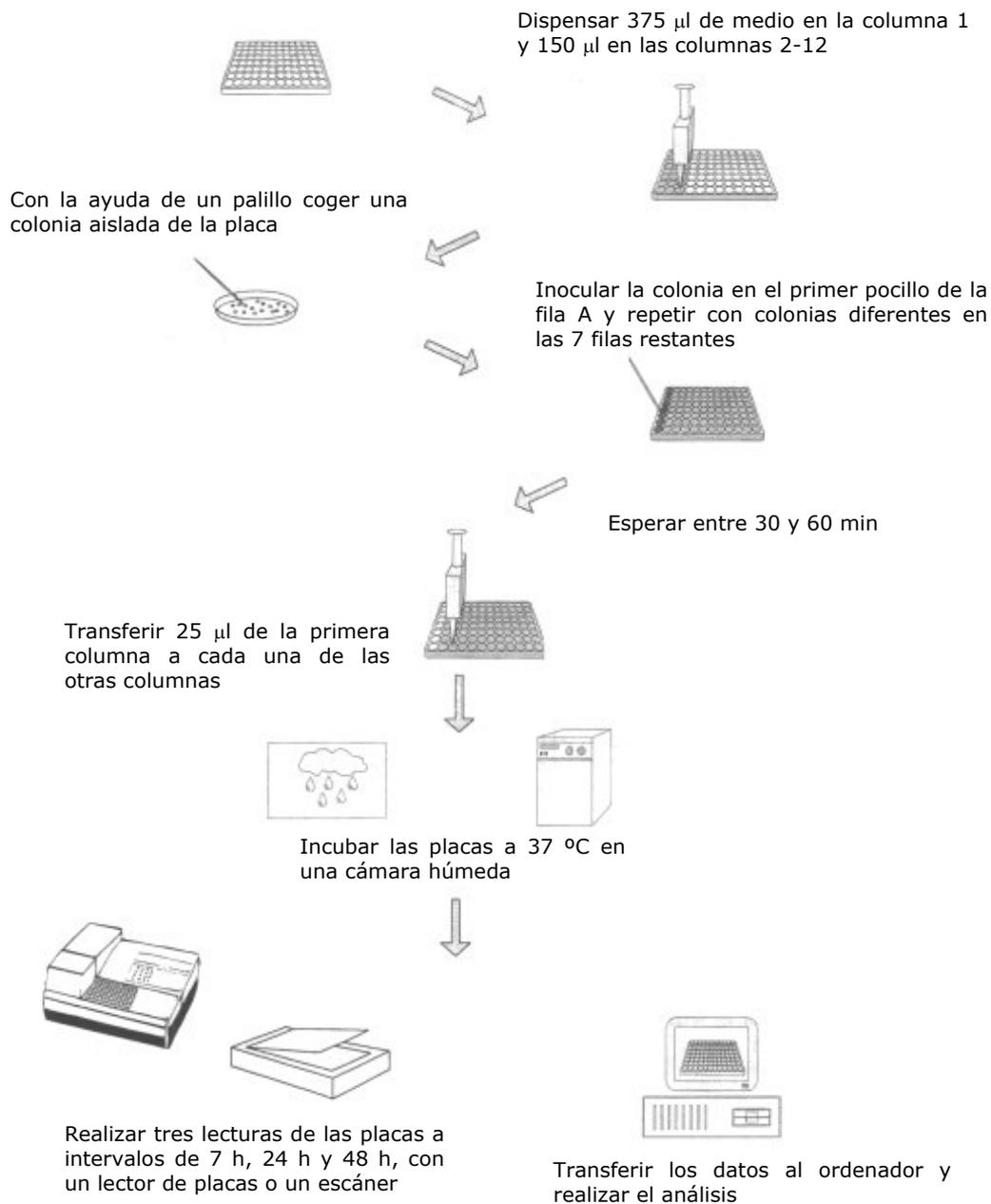
Cada una de las filas fue inoculada con una suspensión bacteriana de la correspondiente cepa a analizar. Esta suspensión se realizó en la primera columna de la placa, ya que esta no contiene ninguna prueba bioquímica.

Como control interno se inocularon dos filas situadas en diferentes placas con la cepa de laboratorio *E. coli* DH5 $\alpha$ .

Posteriormente, las placas fueron incubadas a 37 °C en una cámara húmeda y se realizaron lecturas a las 7 h, 24 h y 48 h a una DO<sub>620nm</sub> del crecimiento.

A partir de los perfiles bioquímicos obtenidos para cada una de las pruebas en cada una de las lecturas, se procedió a la agrupación de las cepas mediante el método UPGMA (*unweighted pair group method analysis*) en función del índice de diversidad de Simpson (69), utilizando el software suministrado por fabricante. Aquellas cepas que presentaron un coeficiente de similitud media superior a 0,975 fueron agrupadas dentro de un mismo grupo fenotípico.

Este sistema de fenotipado bioquímico tiene la particularidad de que en la realización de los cálculos de similitud de las diferentes cepas se valora la cinética de las reacciones producidas además de cuantificar la utilización de cada uno de los substratos.

**Fig. 2.4 - Inoculación de las placas PhP-RE.**

### **2.2.3. Análisis del patrón del lipopolisacárido**

Con el fin de analizar la diversidad en el patrón de lipopolisacárido se realizó una extracción del lipopolisacárido LPS utilizando el método de la proteinasa K (67), descrito en el apartado de Materiales y Métodos generales (III).

A continuación, 10  $\mu$ l de la muestra fueron sometidos por duplicado a electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (96) en una solución formada por 25 mM Tris, 192 mM Glicina y 0,1% SDS utilizando un Mini-Protean II Dual Slab Cell (Bio-Rad, Richmond, USA). Uno de los geles fue teñido con nitrato de plata (195) de acuerdo con el protocolo indicado en el apartado de Materiales y Métodos generales (Anexo III) para estudiar los diferentes patrones de LPS obtenidos, y el otro fue utilizado para la detección del antígeno O157. Para ello, el segundo gel fue electrotransferido utilizando un Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad, Richmond, USA) a membranas de nitrocelulosa (Hybond ECL, Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England) utilizando una solución formada por 25 mM Tris, 192 mM Glicina y 20% de Metanol. El gel fue sometido a 150 V durante 1 h siguiendo las instrucciones del fabricante y, a continuación, se siguió el protocolo de la inmunodetección del antígeno O157 tal como se indica en el apartado de Materiales y Métodos generales (Anexo III).

### **2.2.4. Elección de cepas representativas del estudio**

Con el fin de eliminar del estudio aquellas cepas con características fenotípicas comunes aisladas de una misma muestra, se procedió a la selección de cepas representativas de cada una de las agrupaciones fenotípicas obtenidas mediante el sistema PhenePlate<sup>®</sup>. De cada una de las muestras se seleccionaron como representativas aquellas cepas que mostraron la media de similitud más elevada con relación al resto de cepas agrupadas dentro de un mismo grupo fenotípico. En el caso de que más de una presentase la misma similitud media se escogió aquella que presentó el valor más elevado del coeficiente de similitud mínima (94).

Aquellas cepas que presentaron un patrón de LPS diferente a pesar de

estar agrupadas dentro de un mismo grupo fenotípico fueron incorporadas al estudio.

### **2.2.5. Clasificación de las cepas**

A partir de los resultados obtenidos en el apartado anterior, se procedió a la identificación de las cepas seleccionadas mediante la galería comercial API 20E (BioMérieux, La Balme, Francia), indicada para la identificación de miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, y la secuenciación del gen codificante para la subunidad 16S del ARNr, en los casos en los que no se obtuvo una identificación clara mediante el sistema API 20E.

#### **2.2.5.1. Identificación mediante la galería API 20E**

La galería API 20E fue inoculada de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, se realizó una suspensión de la cepa correspondiente en agua destilada estéril a partir de una colonia de un crecimiento reciente en agar LB y se inocularon los diferentes pocillos siguiendo las indicaciones del fabricante. La galería se incubó a 37 °C y se realizó la lectura de las pruebas bioquímicas a las 24 h. A partir de los perfiles numéricos obtenidos, las cepas fueron identificadas utilizando el libro de identificación API 20E (BioMérieux, La Balme, Francia).

#### **2.2.5.2. Identificación mediante la secuenciación del gen codificante para el ARNr 16S**

Como se ha indicado anteriormente, aquellas cepas que no presentaron los típicos perfiles bioquímicos recogidos en el libro API 20E fueron identificadas mediante la secuenciación del gen que codifica para el ARNr utilizando los cebadores universales para la amplificación de esta molécula en enterobacterias (211):

27-F     5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'  
1492-R   5'-TACGGTTACCTTGTTACGAC-3'

Las condiciones utilizadas para la reacción de PCR fueron las siguientes:

A) Desnaturalización: 5 min a 94 °C

B) Repetición durante 35 ciclos:

Desnaturalización: 1 min a 94 °C

Unión de los cebadores "annealing": 1 min a 55 °C

Elongación: 1 min 30 s a 72 °C

C) Elongación final: 7 min a 72 °C

D) Conservación de la muestra: tiempo indefinido a 4 °C

El producto de la PCR fue visualizado mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0,8% en TBE 1X preparado tal como se indica en el apartado de Materiales y Métodos generales (Anexo III) y tinción con bromuro de etidio.

A continuación, la banda correspondiente al amplímero esperado fue purificada del gel de agarosa utilizando el kit comercial Qiaquick Gel Extraction Kit (Qiagen Inc. Valencia, USA) y 1 µl del ADN purificado fue utilizado como molde en la reacción de secuenciación:

La secuenciación de los amplímeros obtenidos se realizó en las dos direcciones utilizando los mismos cebadores indicados anteriormente. Las condiciones de PCR y la metodología utilizada en la secuenciación se indican en el apartado 1.2.4.6 de Materiales y Métodos del Capítulo 1.

### **2.2.6. Pruebas bioquímicas adicionales**

Adicionalmente, se analizó la capacidad de fermentar el sorbitol y de producir actividad β-D-glucuronidasa (pruebas bioquímicas utilizadas mayoritariamente para diferenciar las cepas de *E. coli* O157:H7 del resto de

cepas de *E. coli*), con el fin de determinar si las cepas aisladas presentaban un perfil bioquímico determinado.

### **2.2.6.1. Fermentación del sorbitol**

La capacidad de fermentar el sorbitol fue evaluada mediante el inóculo de la correspondiente cepa (obtenido a partir de un crecimiento de 24 h en agar LB) en 5 ml de caldo base al Bromocresol Púrpura suplementado con un 1% de D-Sorbitol (Sigma, St. Louis, USA) y la incubación a 37 °C durante 24 h. El viraje de color del caldo (inicialmente de color púrpura) a amarillo, debido a la acidificación del medio por la utilización del sorbitol, fue considerado como reacción positiva.

### **2.2.6.2. Detección de la actividad $\beta$ -D-glucuronidasa**

En el caso de la detección de la actividad  $\beta$ -D-glucuronidasa, se realizó una suspensión de la cepa correspondiente en 250  $\mu$ l de PBS (utilizando el mismo crecimiento que en el apartado anterior), se añadió una pastilla " $\beta$ -D-glucuronidasa" (Diatabs, Rosko, Dinamarca) y se incubó a 37 °C. Se realizó una primera lectura a las 4 h y una segunda lectura a las 24 h. La aparición de una coloración amarilla fue considerada como reacción positiva, según lo indicado por el fabricante.

### **2.2.7. Serotipado**

La determinación de los antígenos O y H de las cepas *stx*<sub>2</sub> aisladas después de ser identificadas como portadoras del gen *stx*<sub>2</sub> mediante la hibridación colonial, fue realizada por el Laboratorio de Referencia de *E. coli* (Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela, Lugo, España), utilizando el método descrito por Guinée *et al.* (61).

En el caso de las cepas de *E. coli* O157:H7, se comprobó la presencia de los genes que codifican para los antígenos O157 y H7 mediante PCR, tal como se indicó en el apartado de Materiales y Métodos del Capítulo 1.

Los cebadores utilizados para la amplificación del gen *fliC<sub>H7</sub>* fueron descritos por Wang *et al.* (2002):

FliC-a 5'-TACCATCGCAAAGCAACTCC-3'

FliC-b 5'-GTCGGCAACGTTAGTGATACC-3'

Asimismo, la expresión del antígeno O157 fue comprobada utilizando el Kit comercial para la detección de dicho antígeno, O157<sup>®</sup> Detection Kit (Merck, Darmstadt, Alemania).

### **2.2.8. Análisis de la susceptibilidad bacteriana a diferentes antibióticos**

Se analizó la susceptibilidad de las cepas a un total de 27 antibióticos mediante la técnica de difusión en agar. Para ello se realizó una suspensión de cada una de las cepas en solución salina y se extendió sobre placas de agar Müller Hinton mediante un hisopo estéril. Los discos de los antibióticos se depositaron sobre las placas y se incubaron a 37 °C durante 24 h. La sensibilidad o resistencia fue determinada en función de los diferentes halos de inhibición producidos.

Los antibióticos analizados fueron el ácido nalidíxico, amikacina, ampicilina, augmentine, aztreonam, cefalotina, cefepime, cefotaxima, cefoxitina, ceftazidima, cefuroxima, ciprofloxacina, cloramfenicol, colistina, cotrimoxazol, estreptomina, fosfomicina, gentamicina, imipenem, kanamicina, nitrofurantoina, piperacilina, piperacilina y tazobactam), sulfonamidas, tetraciclina, tobramicina y trimetoprim.

Este estudio fue realizado con la colaboración del equipo del Dr. Guillem Prats (Hospital de Vall d'Hebrón) a quienes agradecemos su aportación.

### **2.2.9. Caracterización genética de las cepas representativas**

Paralelamente, se realizó la caracterización genética de las cepas con el fin de determinar la variabilidad del gen *stx<sub>2</sub>*, la presencia de más de un gen *stx<sub>2</sub>*, la localización de estos genes en las diferentes cepas, y la presencia de genes

codificantes para otros factores de virulencia previamente descritos (*stx<sub>1</sub>*, *eaeA*, *ehxA* y *saa*).

### **2.2.9.1. Extracción de ADN cromosómico**

La extracción de ADN cromosómico se realizó mediante el tratamiento con lisozima y extracción con fenol-cloroformo, utilizando el método indicado en el apartado de Materiales y Métodos generales (Anexo III).

El ADN extraído fue visualizado mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0,8% en TBE 1X y tinción con bromuro de etidio, tal como se describe en el apartado de Materiales y Métodos generales (Anexo III).

### **2.2.9.2. Localización del gen *stx<sub>2</sub>***

El ADN extraído por el método descrito anteriormente fue digerido con el enzima *EcoRI* (Promega, Madison (Wisconsin), Estados Unidos), utilizando el protocolo descrito en el apartado de Materiales y Métodos generales (Anexo III). Los fragmentos de restricción obtenidos fueron separados mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0,8% en TBE, a un voltaje de 50 V durante 12 h. Posteriormente, se realizó una transferencia a membranas de nylon (Hybond N<sup>+</sup>, Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, Inglaterra) y se realizó una hibridación del ADN (Southern Blot) con la sonda de 378 pb tal como se describe en el apartado de Materiales y Métodos generales (Anexo III).

La detección de más de una banda de restricción *EcoRI* positiva para la hibridación fue considerada como indicativo de la presencia de más de una copia del gen *stx<sub>2</sub>* o de alguna de sus variantes ya que, según se comprobó, estos genes no poseen diana de restricción para este enzima. No obstante, en aquellas cepas en las que se observó diana de restricción para este enzima, se comprobó si presentaban diana para otro enzima, *ClaI*, para el que el que tampoco se ha descrito diana de restricción. Alternativamente, algunas de las bandas fueron escindidas del gel de agarosa y purificadas utilizando el kit comercial Qiaquick Gel Extraction Kit (Qiagen Inc., Valencia, California, Estados Unidos), y 4 µl del ADN purificado fue utilizado como molde para la detección de las diferentes

variantes *stx*<sub>2</sub> en diferentes reacciones de PCR, tal como se describe a continuación.

### **2.2.9.3. Análisis de las variantes del gen *stx*<sub>2</sub>**

#### **2.2.9.3.1. Detección de los genes *stx*<sub>2f</sub>, *stx*<sub>2c</sub>, *stx*<sub>2d</sub>, *stx*<sub>2e</sub> y *stx*<sub>2f</sub> mediante PCR**

La presencia de las 5 principales variantes del gen *stx*<sub>2</sub> descritas hasta el momento fue analizada mediante la técnica de la PCR utilizando los cebadores descritos por Wang *et al.*, 2002 (206). La secuencia nucleotídica, así como también la localización de estos cebadores se indica en el Anexo II.

Las condiciones de PCR utilizadas fueron las mismas que las descritas en el apartado 1.2.6 del Capítulo 1 para la amplificación del gen *rfb*<sub>0157</sub>.

Los amplímeros obtenidos fueron visualizados mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1,5% en TBE, según se indica en el apartado de Materiales y Métodos generales (Anexo III).

#### **2.2.9.3.2. Secuenciación de la subunidad A**

En vista de la existencia de algunas cepas en las que se había detectado la presencia del gen *stx*<sub>2</sub> mediante los cebadores universales indicados en el apartado de Materiales y Métodos del Capítulo 1 y, sin embargo, no mostraron amplificación positiva para ninguna de las variantes utilizando los cebadores específicos indicados en el apartado anterior, se decidió secuenciar la región del gen *stx*<sub>2</sub> codificante para la subunidad A. Los cebadores utilizados fueron descritos por Muniesa *et al.* (119). La secuencia nucleotídica se indica en el Anexo II.

Las condiciones de PCR fueron las siguientes:

A) Desnaturalización: 5 min a 94 °C

B) Repetición durante 35 ciclos:

Desnaturalización: 1 min a 94 °C

Unión de los cebadores "annealing": 1 min a 42 °C

Elongación: 1 min 30 s a 72 °C

C) Elongación final: 7 min a 72 °C

D) Conservación de la muestra: tiempo indefinido a 4 °C

El amplímero obtenido fue visualizado mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8% en TBE 1X, tal como se indica en el apartado de Materiales y Métodos generales (Anexo III).

La banda fue escindida del gel de agarosa, purificada y secuenciada, siguiendo el mismo procedimiento indicado en el apartado 2.2.5.2 del presente capítulo.

Las secuencias obtenidas se compararon con las secuencias depositadas en el GenBank y el EMBL, utilizando el programa BLAST, disponible en la página web: <http://www.ncbi.nlm.nih.com> (Wisconsin Package Version 10.2, Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisconsin, Estados Unidos).

#### **2.2.9.4. Análisis de otros factores de virulencia**

##### **2.2.9.4.1. Detección del gen codificante para la toxina shiga 1, $stx_1$ \***

Los cebadores utilizados para la detección el gen  $stx_1$  fueron descritos por Wang *et al.* (206).

Stx1-a 5'-TCTCAGTGGGCGTTCTTATG-3'

Stx1-b 5'-TACCCCTCAACTGCTAATA-3'

Las condiciones de PCR utilizadas fueron las mismas que las indicadas anteriormente para la amplificación de las diferentes variantes del gen  $stx_2$ .

Asimismo, los amplímeros obtenidos fueron visualizados de la misma manera mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1,5% en TBE 1X.

##### **2.2.9.4.2. Detección del gen codificante para la intimina, $eaeA$ \***

Los cebadores utilizados para la detección del gen  $eaeA$  también fueron los descritos por Wang *et al.* (206).

Eae-a 5'-ATGCTTAGTGCTGGTTTAGG-3'

Eae-b 5'-GCCTTCATCATCATTTTCGCTTTC-3'

Las condiciones de PCR utilizadas fueron las mismas que las indicadas anteriormente y los amplímeros obtenidos fueron visualizados de la misma manera mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1,5% en TBE 1X.

##### **2.2.9.4.3. Detección del gen codificante para la hemolisina enterohemorrágica, $ehxA$ \***

Los cebadores utilizados para la detección el gen  $ehxA$  fueron los descritos por Wang *et al.* (206).

\* La detección de estos genes fue confirmada en el Laboratorio de Referencia de *E. coli* (Lugo) por el equipo de investigación del Dr. J. Blanco.

HlyA-a 5'-AGCTGCAAGTGCGGGTCTG-3'

HlyA-b 5'-TACGGGTTATGCCTGCAAGTTCAC-3'

Las condiciones de PCR utilizadas fueron las mismas que las indicadas anteriormente.

#### **2.2.9.4.4. Detección del gen codificante para la adhesina codificada por el gen saa**

Los cebadores utilizados en este estudio fueron los descritos por Paton y Paton, (142):

SAADF 5' -CGTGATGAACAGGCTATTGC-3'

SAADR 5' -ATGGACATGCCTGTGGCAAC-3'

Estos cebadores amplifican una región de 119 pb situada entre la posición 2652 y 2770 de la secuencia AF325220 depositada en el GenBank.

#### **2.2.10. Detección de la producción de la proteína Stx**

Para la detección de la producción de proteína Stx se utilizó el Kit comercial Duopath® Verotoxin, capaz de detectar simultáneamente la Stx<sub>1</sub> y la Stx<sub>2</sub>. Este kit se basa en la utilización de papel cromatográfico y anticuerpos anti-Stx<sub>1</sub> y anti-Stx<sub>2</sub> marcados con oro coloidal para la detección de estas proteínas. Básicamente, consiste en depositar la muestra sobre el papel cromatográfico y, cuando ésta llega a la zona reactiva, en el caso de que haya presencia de proteína un segundo anticuerpo se une al complejo antígeno-anticuerpo, provocando la aparición de una franja de color rojo, que es interpretada como reacción positiva. El protocolo seguido para la preparación de la muestra se indica en el apartado de Materiales y Métodos generales (Anexo III).

## 2.3 - Resultados\*

### 2.3.1. Fenotipado bioquímico mediante el sistema PhenePlate®

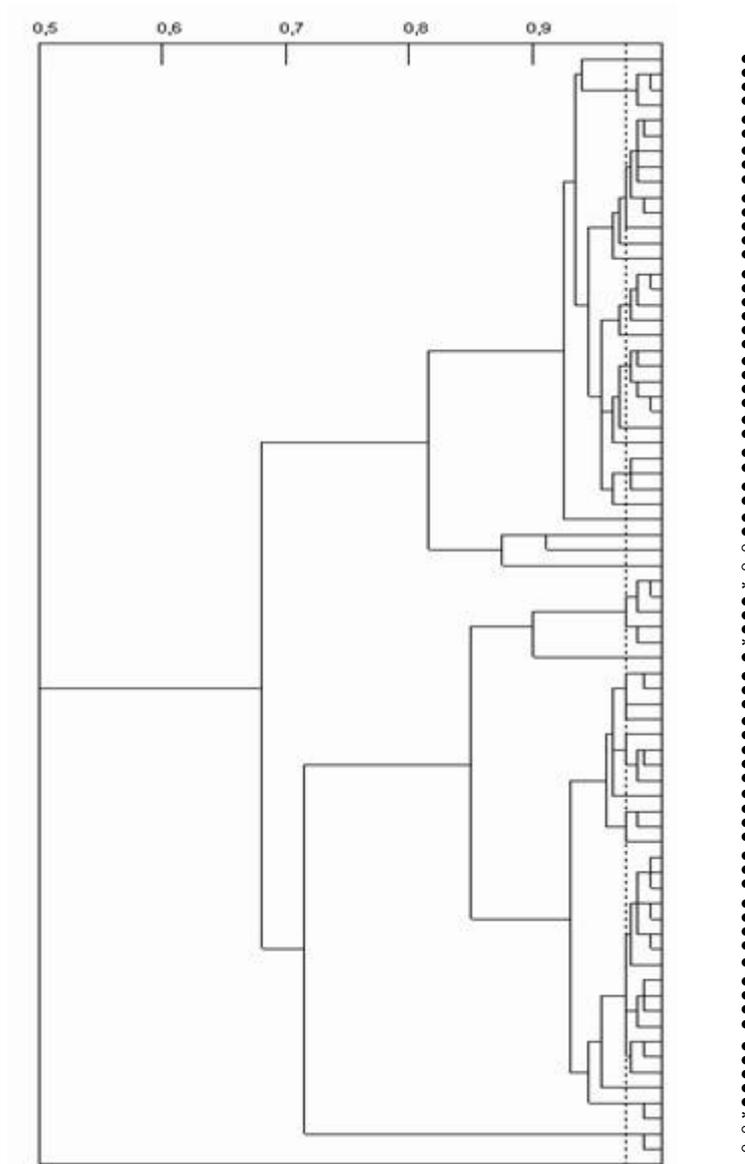
Las 144 cepas aisladas después de su identificación como portadoras del gen *stx*<sub>2</sub> atendiendo a los resultados de la hibridación colonial fueron clasificadas en grupos atendiendo a los diferentes perfiles bioquímicos obtenidos mediante el sistema PhenePlate®.

Se diferenciaron un total de 48 perfiles bioquímicos diferentes, sin observarse una relación entre el perfil bioquímico y el origen de las cepas. Así pues, algunas cepas pertenecientes a diferentes orígenes fueron clasificadas dentro de un mismo grupo fenotípico, obteniéndose un índice de diversidad de 0,96.

En el caso de las 72 cepas de *E. coli* O157 aisladas mediante la técnica de la separación inmunomagnética, siembra en CT-SMAC y detección inmunológica, se diferenciaron 26 grupos fenotípicos diferentes. El índice de diversidad fue de 0,94. No obstante, se observaron dos grandes agrupaciones relacionadas con la capacidad de fermentar el sorbitol de las cepas (**Figura 2.5**).

\* En el **Anexo I** se resume la información presentada en este Capítulo

**Fig. 2.5** - Dendograma que muestra la diversidad fenotípica de las cepas O157 aisladas tras la separación inmunomagnética, siembra en agar CT-SMAC e inmunodetección colonial.



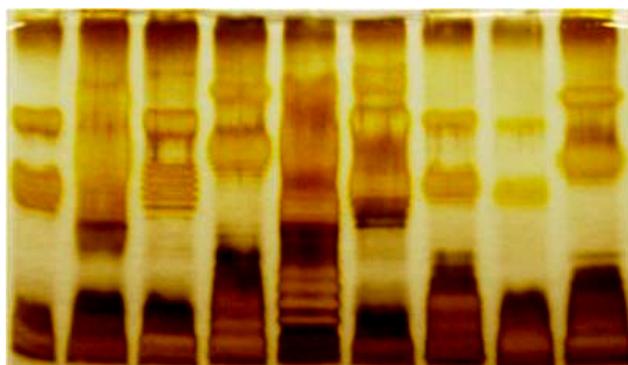
(\*) Cepas aisladas de agua residual urbana; (●•) Cepas aisladas de agua residual de matadero bovino; (°) Cepas aisladas de agua residual de matadero porcino.

### 2.3.2. Análisis del patrón del lipopolisacárido

Se observó una elevada diversidad en los patrones de digestión del lipopolisacárido (LPS) (**Figura 2.6**). No obstante, únicamente 4 de las 144 cepas *stx*<sub>2</sub> presentaron el patrón típico del antígeno O157, las cuales habían sido incluidas dentro de un mismo grupo fenotípico y eran procedentes de la misma muestra.

En el caso de las 72 cepas O157, todas ellas presentaron el patrón de LPS esperado aunque con alguna pequeña variación, como se mostró en la **Figura 1.14** del Capítulo 1.

**Fig 2.6.** Patrones de LPS de algunas de las cepas aisladas.



### 2.3.3. Elección de cepas representativas

Se escogieron cepas representativas de cada una de las muestras atendiendo al grupo fenotípico en el que fueron clasificadas y al patrón del LPS observado. Así pues, aquellas cepas que, a pesar de presentar el mismo perfil bioquímico, tenían un patrón de LPS diferente y/o fueron aisladas de muestras diferentes fueron incluidas en el estudio posterior. De esta manera, se escogieron un total de 65 de las 144 cepas *stx*<sub>2</sub> aisladas mediante la hibridación colonial (denominadas como S1, S2,...) y 28 de las 72 cepas *E. coli* O157 aisladas mediante la detección inmunológica (denominadas como O1, O2,...)

El origen de estas cepas se resume en la siguiente tabla:

**Tabla 2.2-** Distribución del número de las cepas representativas en función del origen de la muestra de donde fueron aisladas:

a) Cepas representativas de las 144 cepas *stx*<sub>2</sub> aisladas mediante la hibridación colonial

Planta depuradora/Matadero*	Origen	Nº de Cepas originales	Nº de Cepas seleccionadas
EDAR 1 (Gavà, Barcelona)	H	54	4
EDAR 3 (Taradell, Barcelona)	H	7	5
EDAR 5 (Ampolla, Tarragona)	H	5	5
Matadero bovino (Barcelona)	A	47	30
Heces de bovinos (Breda, Barcelona)	A	8	6
Matadero porcino (Sta. Eugènia de Berga, Barcelona)	A	2	2
Matadero porcino (Girona)	A	4	4
Matadero mixto (bovino, caprino, ovino y aves de corral) (Girona)	A	17	9

\* Las características de las Plantas depuradoras se indicaron en el apartado de Materiales y Métodos del Capítulo 1. **A**, Origen animal de la muestra; **H**, Origen urbano de la muestra.

- b) Cepas representativas de las 72 cepas O157 tras la separación inmunomagnética, siembra en CT-SMAC e inmunodetección colonial

Planta depuradora/Matadero*	Origen	Nº de Cepas
EDAR 1 (Gavà)	H	3
Matadero bovino	A	22
Matadero porcino (2)	A	3

\* Las características de las EDARs depuradoras se indicaron en el apartado de Materiales y Métodos del Capítulo 1. **A**, Origen animal de la muestra; **H**, Origen humano de la muestra.

Los ensayos realizados a continuación hacen referencia exclusivamente a estas cepas que fueron seleccionadas como cepas representativas (65 en el caso de las cepas *stx*<sub>2</sub> y 28 en el caso de las cepas O157 aisladas selectivamente).

### 2.3.4. Clasificación de las cepas

#### 2.3.4.1. Identificación mediante la galería API 20E

La mayoría de cepas fueron clasificadas como *Escherichia coli*, siendo los códigos 5144552 y 5144572 los más frecuentemente observados.

Un total de 7 cepas (6 de las 65 cepas *stx*<sub>2</sub> (las cepas S48, S102, S138, S140, S141 y S147) y 1 de las 28 cepas de *E. coli* O157 (la cepa O151) no pudieron ser identificadas mediante esta técnica por los resultados atípicos de algunas de las pruebas bioquímicas. Entre estos resultados atípicos hay que destacar la prueba de la Urea positiva, la prueba del Indol negativa, o la prueba de la producción de H<sub>2</sub>S positiva. Además 6 cepas mostraron una identificación poco discriminadora (cepas S86, S90, S91, S93, S107 y S110), por lo que se decidió secuenciar el gen que codifica para el ARNr 16S de todas estas cepas.

### **2.3.4.2. Identificación mediante la secuenciación del gen codificante para el ARNr 16S**

La secuencia del gen del ARNr 16S de las cepas analizadas mostró una homología de entre el 98% y el 100% con el gen codificante para el ARNr 16S de *E. coli* (GenBank AF233451 y Z83203), dependiendo de la cepa, en un fragmento de ADN de aproximadamente 1250 pb que fue secuenciado.

### **2.3.5. Pruebas bioquímicas adicionales**

#### **2.3.5.1. Fermentación del sorbitol**

Todas las cepas de *E. coli* pertenecientes al serotipo O157 que eran portadoras del gen *stx*<sub>2</sub> fueron negativas para la prueba de fermentación de sorbitol. Por el contrario, la mayoría de cepas *stx*<sub>2</sub> pertenecientes a otros serotipos fueron capaces de fermentar el sorbitol presentando, pues, el patrón típico de *E. coli*. Únicamente cinco cepas, pertenecientes a los serotipos O2:H21, O159:H<sup>-</sup>, O171:H2, ONT:H21 y ONT:H<sup>-</sup>, no fueron capaces de fermentar el sorbitol en 24 h.

#### **2.3.5.2. Detección de la actividad $\beta$ -D-glucuronidasa**

En referencia a la detección de la actividad  $\beta$ -D-glucuronidasa, nuevamente, la mayoría de las cepas portadoras del gen *stx*<sub>2</sub> presentaron una reacción positiva, mostrando el patrón típico de *E. coli*. En cambio, en las cepas de *E. coli* pertenecientes al serotipo O157 que eran portadoras del gen *stx*<sub>2</sub> no se detectó actividad  $\beta$ -D-glucuronidasa. Asimismo, en otras seis cepas, una de las cuales también había mostrado incapacidad de fermentar el sorbitol (serotipo O171:H2), tampoco se detectó esta actividad. El resto de cepas en las que no se detectó esta actividad pertenecían a los serotipos O89:H19, O181:H49 y ONT:H<sup>-</sup>.

Hay que señalar que todas las cepas de *E. coli* O157 aisladas que no eran portadoras del gen *stx*<sub>2</sub>, con la excepción de una, que no producía actividad  $\beta$ -D-glucuronidasa, presentaron el patrón típico de *E. coli* (fermentación de sorbitol y actividad  $\beta$ -D-glucuronidasa positivas).

### 2.3.6. Serotipado

Se detectaron un total de 35 serotipos diferentes, relacionado con la elevada diversidad de patrones de LPS indicada anteriormente. Como se muestra en la **Tabla 2.3**, cada muestra procedente de un determinado origen presentó una distribución particular de serotipos. Únicamente el serotipo O171:H2 fue detectado en muestras tanto de agua residual urbana como de agua residual de matadero bovino. No obstante, debido al bajo número de cepas aisladas los resultados no son estadísticamente significativos.

No obstante algunos antígenos somáticos fueron detectados en varias muestras. Este es el caso del antígeno somático O8, presente en cepas tanto de origen humano (en combinación con el antígeno flagelar H9), como bovino (en combinación con el antígeno flagelar H31) o porcino, en el que la cepa aislada fue H<sup>-</sup>. En el caso del antígeno somático O2, fue detectado en combinación con los antígenos flagelares H2 y H25, en cepas aisladas de agua residual de matadero bovino, y con el antígeno flagelar H21, en muestras de agua residual de matadero porcino.

En el caso de las cepas O157, aisladas selectivamente para la presencia de este antígeno, se detectaron en los 3 tipos diferentes de muestras ensayados, agua residual urbana, de matadero bovino y de matadero porcino. De las 28 cepas analizadas, el 50% eran portadoras del gen *fliC<sub>H7</sub>*, todas ellas aisladas de agua residual de matadero bovino. Estas cepas no han sido tenidas en cuenta en la elaboración de la **Tabla 2.3**.

**Tabla 2.3** - Distribución de los diferentes serotipos detectados en las cepas *stx*<sub>2</sub> aisladas de forma no selectiva en función del origen de la muestra de donde fueron aislados

Agua residual urbana			Agua residual de matadero bovino			Agua residual de matadero porcino			Agua residual de origen mixto <sup>a</sup>		
O	H	n	O	H	n	O	H	n	O	H	n
O8	H9	3	O1	H20	2	O2	H21	1	O2	H25	1
O70	H <sup>-</sup>	1	<b>O2</b>	<b>H2</b>	<b>1<sup>b</sup></b>	O8	H <sup>-</sup>	1	O26	H <sup>-</sup>	1
O90	H <sup>-</sup>	3	O2	H25	4	O26	H <sup>-</sup>	1	O90	H <sup>-</sup>	1
<b>O127</b>	<b>H<sup>-</sup></b>	<b>1<sup>b</sup></b>	<b>O8</b>	<b>H31</b>	<b>1<sup>b</sup></b>	O54	H21	1	O175	H16	1
O146	H <sup>-</sup>	1	O22	H8	2	O100	H <sup>-</sup>	1	<b>O177</b>	<b>H<sup>-</sup></b>	<b>1<sup>b</sup></b>
O146	H21	1	O76	H2	1	O159	H <sup>-</sup>	1	ONT	H <sup>-</sup>	3
<b>O166</b>	<b>H21</b>	<b>1<sup>b</sup></b>	<b>O89</b>	<b>H19</b>	<b>1<sup>b</sup></b>				ONT	H21	1
O171	H2	2	O91	H21	1						
ONT	H9	1	O98	HNT	1						
			O113	H21	1						
			O136	H1	1						
			O157	H <sup>-</sup>	1 <sup>c</sup>						
			<b>O162</b>	<b>H7</b>	<b>1<sup>b</sup></b>						
			O171	H2	13						
			<b>O181</b>	<b>H20</b>	<b>2<sup>b</sup></b>						
			<b>O181</b>	<b>H49</b>	<b>1<sup>b</sup></b>						
			ONT	H <sup>-</sup>	1						
			ONT	HNT	1						

**O**, expresión del antígeno O; **H**, expresión del antígeno H; **NT**, antígeno no tipable; **H<sup>-</sup>** cepas no móviles; **n**, número de cepas pertenecientes a un determinado serotipo.

<sup>a</sup> cepas aisladas de agua residual de matadero de ganado bovino, porcino, ovino, caprino y aves de corral; <sup>b</sup> Serotipos STEC que no han sido descritos previamente (resaltados en negrita); <sup>c</sup> Únicamente se han tenido en cuenta aquellas cepas que fueron aisladas mediante la hibridación colonial con la sonda para el gen *stx*<sub>2</sub>.

Si bien muchas de las cepas aisladas pertenecieron a serotipos que habían sido previamente descritos como portadores del gen *stx*<sub>2</sub>, se detectaron 8 serotipos de *E. coli* que en el momento de redacción de este trabajo no habían sido descritos como pertenecientes al grupo STEC de acuerdo con la fuente consultada (<http://www.sciencenet.com.au/vtetable.htm>).

### 2.3.7. Análisis de la sensibilidad a diferentes antibióticos

En general, se observó una elevada resistencia a las sulfonamidas, tetraciclina, cloramfenicol, trimetoprim, estreptomina y cotrimoxazol, presentando valores de resistencia o resistencia parcial el 62,90%, 69,35%, 71,03%, 58,06% y 46,77% de las cepas, respectivamente (**Tabla 2.4**). Por el contrario, la mayoría de las cepas aisladas fueron sensibles al ácido nalidíxico, ampicilina, kanamicina, ciprofloxacina, tobramicina, amikacina, augmentine, aztreonam, cefalotina, cefepime, cefotaxima, ceftazidima, cefuroxima, colistina, fosfomicina, gentamicina, imipinem, nitrofurantoina, piperacilina y piperacilin-tazobactam. Asimismo, el 74,19% de las cepas mostró resistencia a dos o más antibióticos.

No se observó ninguna relación entre el origen de las muestras de donde fueron aisladas las cepas y el patrón de resistencia observado. Del mismo modo, tampoco se observó relación entre el serotipo y la resistencia a los diferentes antibióticos. A modo de ejemplo, el serotipo O171:H2, del que se aislaron un mayor número de cepas (en este estudio se analizaron 14), de las dos cepas que fueron aisladas de agua residual urbana únicamente una presentó resistencia intermedia a la tetraciclina, mientras que el resto de cepas del mismo serotipo aisladas de agua residual animal (12), presentó variabilidad en la resistencia a sulfonamidas, cotrimoxazol y cloramfenicol (10 cepas resistentes), estreptomina (8 cepas resistentes), tetraciclina (5 cepas resistentes), ácido nalidíxico (4 cepas resistentes), gentamicina, kanamicina y tobramicina (1 cepa resistente).

Este análisis únicamente se realizó con las cepas portadoras del gen *stx*<sub>2</sub> aisladas mediante la hibridación colonial.

**Tabla 2.4** - Resistencia de las cepas *stx*<sub>2</sub> aisladas a los diferentes antibióticos.

Antibióticos	Agua residual urbana <sup>a</sup>	Agua residual de matadero y heces de bovino <sup>a</sup>	Agua residual de matadero porcino <sup>a</sup>	Agua residual de origen mixto <sup>a</sup>	% de resistencia <sup>b</sup>
Ácido Nalidíxico	15,38	11,43	20,00	44,44	17,74
Ampicilina	15,38	2,86	20,00	33,33	11,29
Cefalotina	0,00	0,00	0,00	11,11	1,61
Ciprofloxacina	0,00	0,00	0,00	33,33	4,84
Cloranfenicol	53,85	85,71	100,00	77,78	79,03
Cotrimoxazol	30,77	37,14	20,00	88,89	41,94
Estreptomicina	38,46	60,00	40,00	88,89	58,06
Gentamicina	0,00	5,71	0,00	0,00	3,23
Kanamicina	0,00	17,14	20,00	55,56	19,35
Nitrofurantoina	0,00	0,00	0,00	11,11	1,61
Piperacilina	0,00	0,00	0,00	11,11	1,61
Sulfonamidas	38,46	62,86	60,00	100,00	62,90
Tetraciclina	53,85	65,71	80,00	100,00	69,35
Tobramicina	0,00	5,71	0,00	0,00	3,23
Trimetoprim	30,77	45,71	20,00	88,89	46,77
<i>Nº de cepas</i> <sup>c</sup>	13	35	5	9	62

<sup>a</sup> Porcentaje de cepas aisladas de los diferentes orígenes que presentaron resistencia a algún antibiótico; <sup>b</sup> Porcentaje de cepas totales resistentes a algún antibiótico; <sup>c</sup> Número de cepas analizadas aisladas de cada uno de los diferentes orígenes.

### **2.3.8. Caracterización genética de las cepas *stx*<sub>2</sub> representativas**

#### **2.3.8.1. Detección del gen *stx*<sub>2</sub> mediante PCR**

El gen *stx*<sub>2</sub> fue detectado mediante PCR en las todas las cepas aisladas mediante la hibridación colonial utilizando los cebadores que amplifican cualquier variante del gen *stx*<sub>2</sub>, observándose la banda de 378 pb esperada, correspondiente al fragmento genérico del gen *stx*<sub>2</sub> de la región de ADN que codifica para la subunidad A de la toxina.

No obstante, se observó pérdida del gen *stx*<sub>2</sub> en cuatro de las cepas *stx*<sub>2</sub> tras las sucesivas resiembras (cepas S68, S70, S94 y S96). Estas cepas fueron incluidas en el estudio ya que en los cultivos primarios sí que se observó amplificación del fragmento (todas ellas fueron aisladas de agua residual de matadero bovino).

Por otro lado, en referencia a las cepas de *E. coli* O157 que fueron aisladas selectivamente, el 50% de ellas presentó el gen *stx*<sub>2</sub>. Hay que destacar que estas cepas fueron las que habían presentado las características típicas del serotipo O157:H7, actividad β-D-glucuronidasa negativa y ausencia de fermentación de sorbitol en 24 h. Además, fueron aisladas exclusivamente de agua residual de matadero bovino.

#### **2.3.8.2. Análisis de las variantes del gen *stx*<sub>2</sub>**

##### **2.3.8.2.1. Detección de los genes *stx*<sub>2f</sub>, *stx*<sub>2c</sub>, *stx*<sub>2d</sub>, *stx*<sub>2e</sub> y *stx*<sub>2f</sub> mediante PCR**

Con el fin de analizar la diversidad de genes de la familia *stx*<sub>2</sub> en los diferentes serotipos de *E. coli* identificados se analizó mediante PCR la presencia de las principales variantes del gen *stx*<sub>2</sub> descritas. Se detectaron todas ellas con la excepción de la *stx*<sub>2f</sub>, observándose, además, diferencias en función del origen de las muestras de donde fueron aisladas. Así pues, mientras que las cepas que fueron aisladas de agua residual urbana presentaron mayoritariamente el gen *stx*<sub>2d</sub>, las cepas de agua residual de matadero bovino y heces de bovinos

presentaron mayoritariamente las variantes del gen *stx*<sub>2</sub> y *stx*<sub>2cr</sub>, y las cepas de agua residual de matadero porcino presentaron exclusivamente el gen *stx*<sub>2e</sub> (**Tabla 2.5**).

Además, tal como se muestra en la **Tabla 1** del Anexo I, algunas de las cepas presentaron amplificación positiva para dos variantes diferentes.

En otros casos, sin embargo, a pesar de que 10 de las cepas mostraron amplificación positiva para el fragmento genérico del gen *stx*<sub>2</sub>, no se observó amplificación positiva con ninguno de los cebadores utilizados para detección de las diferentes variantes *stx*<sub>2</sub>. En estos casos se optó por la secuenciación de la subunidad A con el fin de establecer homología con el resto de secuencias depositadas en los bancos genéticos (GenBank y EMBL) tal como se describe en el apartado siguiente.

En cuanto a las cepas O157, las 14 cepas que amplificaron para el fragmento genérico de 378 pb, amplificaron con los cebadores específicos para la variante *stx*<sub>2cr</sub>, variedad que parece dominante en nuestra área geográfica en estas cepas.

#### **2.3.8.2.2. Secuenciación de la subunidad A**

Se obtuvieron fragmentos nucleotídicos de aproximadamente 950 pb en 8 de las cepas que fueron secuenciadas utilizando los cebadores que amplifican la subunidad A del gen *stx*<sub>2</sub>. Estas secuencias mostraron una similitud del 99,8% con una variante que había sido recientemente descrita y de la que aún no teníamos constancia cuando se realizó esta caracterización, la *stx*<sub>2g</sub> (100), depositada en la base de datos genética (GenBank AY286000). Posteriormente se confirmó la presencia de esta variante en el resto de las cepas mediante la técnica de la PCR utilizando los cebadores específicos para esta variante indicados en el Anexo II. Todas estas cepas que presentaron la variante *stx*<sub>2g</sub> fueron aisladas de agua residual de matadero bovino.

En una de las dos cepas restantes que no amplificaron con los cebadores específicos para las variantes *stx*<sub>2</sub> analizadas, no se consiguió secuenciar todo el

fragmento de la subunidad A debido a que no mostró una amplificación positiva con los cebadores S2Aup y S2Alp. En este caso se optó por secuenciar el fragmento resultante de la amplificación mediante los cebadores S2Aup-LP, de aproximadamente 600 pb, observándose una similitud de la secuencia obtenida con la variante *stx<sub>2c</sub>* (GenBank M59432) del 99,9%.

En la otra cepa se obtuvo un fragmento de aproximadamente 950 pb que mostró una similitud del 98,8% de homología con el gen *stx<sub>2e</sub>* (GenBank M36727).

**Tabla 2.5** - Distribución de las diferentes variantes *stx<sub>2</sub>* en las cepas aisladas de los diferentes tipos de agua residual

Origen	N	<i>stx<sub>2</sub></i>	<i>stx<sub>2c</sub></i>	<i>stx<sub>2d</sub></i>	<i>stx<sub>2e</sub></i>	<i>stx<sub>2f</sub></i>	<i>stx<sub>2g</sub></i>
<b>Agua residual urbana</b>	14	3	1	8	5	0	0
<b>Agua residual matadero y heces de bovinos</b>	50	8	38 <sup>a b</sup>	0	0	0	8 <sup>d</sup>
<b>Agua residual matadero porcino</b>	6	0	0	0	6 <sup>c</sup>	0	0
<b>Agua residual origen mixto</b>	9	1	0	1	6	0	0
<b>Total</b>	79	12	39	9	17	0	8

N, número de cepas totales analizadas, *stx<sub>2</sub>*, *stx<sub>2c</sub>*, *stx<sub>2d</sub>*, *stx<sub>2e</sub>*, *stx<sub>2f</sub>*, y *stx<sub>2g</sub>*, variantes del gen *stx<sub>2</sub>*; <sup>a</sup> Se incluyen las 14 cepas O157 aisladas selectivamente; <sup>b</sup> En una de las cepas no se obtuvo amplificación con los cebadores específicos pero fue clasificada variante *stx<sub>2c</sub>* tras la secuenciación; <sup>c</sup> En una de las cepas no se obtuvo amplificación con los cebadores específicos pero fue clasificada variante *stx<sub>2e</sub>* tras la secuenciación; <sup>d</sup> Cepas en las que se identificó la variante *stx<sub>2g</sub>* tras la secuenciación

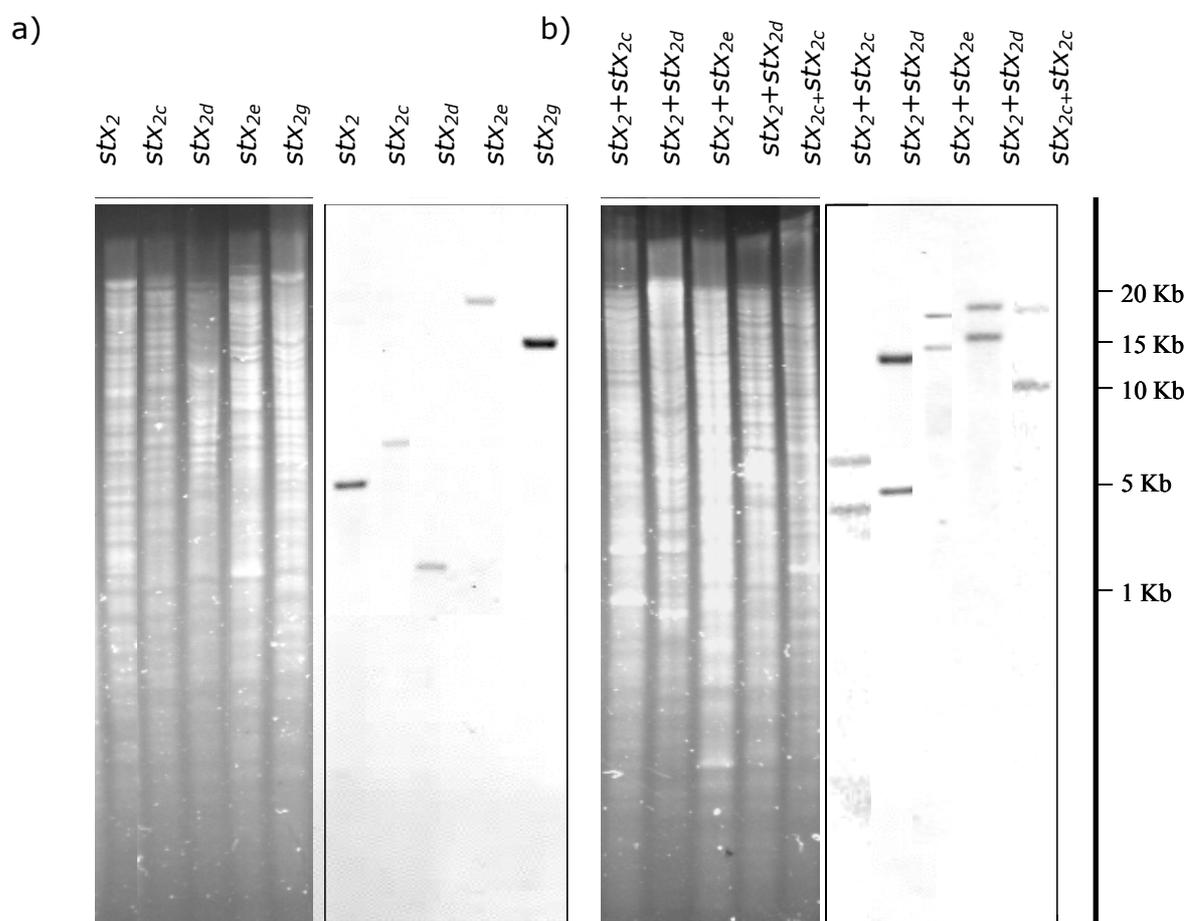
### **2.3.8.2.3. Confirmación de la presencia de más de una copia del gen *stx*<sub>2</sub>**

Con el fin de confirmar la presencia de una o más copias del gen *stx*<sub>2</sub> o de alguna de sus variantes que habían sido detectadas mediante PCR, se analizó la presencia de uno o más fragmentos de restricción *EcoRI* positivos tras la digestión del ADN genómico con este enzima, la electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos generados en la digestión, la transferencia a la membrana y la hibridación con la sonda de 378 pb, tal como se indicó en el apartado de Materiales y Métodos de este capítulo.

Mientras que en tres cepas no fue posible visualizar el fragmento de restricción *EcoRI* correspondiente al gen *stx*<sub>2</sub> (cepas S48, S68 y S94), en el resto de cepas en las que se habían detectado la presencia de dos variantes del gen *stx*<sub>2</sub> se obtuvieron las dos bandas esperadas (**Figura 2.7**).

Hay que destacar que en algunos casos se obtuvieron dos bandas positivas a pesar de que mediante la técnica de la PCR únicamente se observó amplificación positiva para una de las variantes. La detección de estas dos bandas fue asociada con la presencia de más de una copia del mismo gen, aunque únicamente tuvo lugar en 4 casos.

**Fig. 2.7-** Detección del fragmento *Eco*RI del ADN cromosómico que hibrida con la sonda de 378 pb: a) Cepas con una sola copia del gen *stx*<sub>2</sub> o de sus variantes; b) Cepas con dos copias del gen *stx*<sub>2</sub> o de alguna de sus variantes



### 2.3.8.3. Análisis de otros factores de virulencia

#### 2.3.8.3.1. Detección del gen codificante para la toxina shiga 1, *stx*<sub>1</sub>

El gen *stx*<sub>1</sub> no se detectó en ninguna de las cepas aisladas de agua residual de matadero porcino. En las muestras de agua residual urbana y agua residual de matadero y heces de bovinos se detectó en un 28% y un 20% de las cepas de cada una de las muestras, respectivamente. Este gen también fue detectado en una de las nueve cepas aisladas de agua residual de origen mixto este gen (11%).

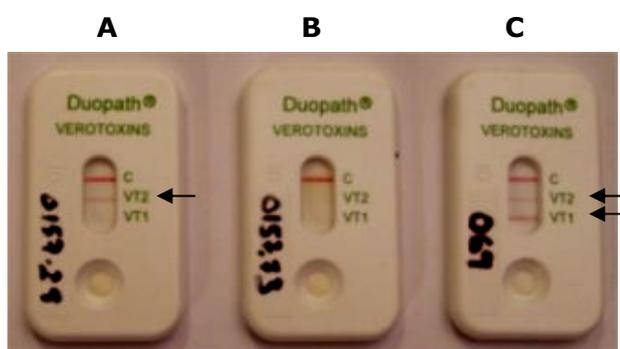
### 2.3.8.3.2. Detección de producción de la proteína Stx<sub>1</sub> y Stx<sub>2</sub>

La producción de proteína Stx<sub>2</sub> fue detectada únicamente en un 7% (1 de 14) de las cepas aisladas del agua residual urbana, en las que sí que se había detectado la presencia de alguna de las variantes del gen *stx*<sub>2</sub>. En cuanto a las cepas aisladas del agua residual de matadero y heces de bovinos, el porcentaje de producción de Stx<sub>2</sub> fue muy superior, el 80% (40 de 50). En el caso de las cepas de agua residual de los mataderos porcinos, no se detectó producción de proteína Stx<sub>2</sub> en ninguna de las muestras. El motivo de la no detección de la proteína Stx<sub>2</sub> en un elevado porcentaje de las cepas que sí que presentaba el gen *stx*<sub>2</sub> será analizado en la discusión.

En el caso de la producción de proteína Stx<sub>1</sub> se detectó un mayor porcentaje de cepas, que además de ser portadoras del gen *stx*<sub>1</sub>, expresaban el gen, tanto en el caso de las cepas aisladas de agua residual urbana, como en agua residual de matadero y heces de bovinos. Así pues, mientras que en el caso del agua residual urbana se detectó esta proteína en un 75% de las cepas que eran portadoras del gen *stx*<sub>1</sub> (3 de 4), en el caso de las muestras de agua residual de matadero y heces de bovinos fue del 100% (10 de 10).

En la **Figura 2.8** se muestra el sistema utilizado para la detección de estas dos proteínas.

**Fig.2.8** - Detección de producción de la proteína Stx<sub>1</sub> y Stx<sub>2</sub>



**A**, detección de Stx<sub>2</sub>; **B**, no detección de Stx<sub>1</sub> ni de Stx<sub>2</sub>; **C**, detección de Stx<sub>1</sub> y Stx<sub>2</sub>

### **2.3.8.3.3. Detección del gen codificante para la intimina, eaeA**

El gen *eaeA* fue detectado únicamente en la cepa de *E. coli* O157:H<sup>-</sup> y en las cepas de *E. coli* O157 que todas las cepas que dieron positivo en la amplificación del gen *fliC<sub>H7</sub>* (las mismas 14 cepas que eran portadoras del gen *stx<sub>2</sub>* y que presentaron las características típicas del serotipo O157:H7).

### **2.3.8.3.4. Detección del gen codificante para la hemolisina enterohemorrágica, ehxA**

El gen de la enterohemolisina, en cambio, fue detectado en un mayor porcentaje de cepas. Así pues, este gen fue detectado en un 7% de las cepas aisladas de agua residual urbana (1 de 14), en el 46% (23 de 50) de las cepas aisladas de agua residual de matadero bovino y heces de bovinos y en el 11% (1 de 9) de las cepas de agua residual de origen mixto. No obstante, no fue detectado en ninguna de las cepas de agua residual de matadero porcino.

### **2.3.8.3.5. Detección del gen saa**

En cuanto al gen *saa*, únicamente fue detectado en 5 de las 50 cepas aisladas de agua residual de matadero y heces de bovinos, que no eran portadoras del gen *eaeA*, representados por los serotipos O76:H2, O22:H8, O181:H49 y O1:H20 (2 cepas).

## **2.3.9. Seropatotipos**

Se observó una elevada diversidad de seropatotipos (combinaciones de genes de virulencia en cada uno de los serotipos) independientemente del origen de la muestra (**Tabla 2.6**). Un ejemplo de ello es la combinación de los genes *stx<sub>1</sub>* y *stx<sub>2d</sub>* en tres aislamientos diferentes pertenecientes a los serotipos O166:H21, O70:H<sup>-</sup> y O90:H<sup>-</sup>.

El patotipo más frecuentemente observado fue el de las cepas que eran portadoras únicamente de la variante *stx<sub>2c</sub>* (en muestras de origen bovino) y de

la variante *stx*<sub>2e</sub> (en muestras de origen bovino y de agua residual urbana), representados por los serotipos O171:H2, O181:H20, ONT:H<sup>-</sup>, ONT:HNT, en muestras de origen bovino, y por los serotipos O2:H21, O26:H<sup>-</sup>, O54:H21, O8:H<sup>-</sup>, O8:H9, ONT:H<sup>-</sup>, ONT:H21, en muestras de agua residual urbana. Los serotipos O157:H<sup>-</sup> y H7 fueron los únicos que presentaron la combinación de los principales factores de virulencia implicados en patogénesis humana (*eaeA/ehxA/stx*<sub>1</sub>/*stx*<sub>2c</sub>).

Tal como se muestra en la **Tabla 2.6** un total de 7 patotipos fueron representados por un único serotipo: O146:H21 (*ehxA/stx*<sub>1</sub>/*stx*<sub>2d</sub>), O22:H8 (*ehxA/stx*<sub>1</sub>/*stx*<sub>2c</sub>), O113:H21 (*ehxA/stx*<sub>2</sub>), O91:H21 (*ehxA/stx*<sub>2</sub>/*stx*<sub>2c</sub>), O171:H2 (*stx*<sub>2c</sub>/*stx*<sub>2d</sub>), O90:H<sup>-</sup> (*stx*<sub>2d</sub>), O175:H16 (*ehxA/stx*<sub>2e</sub>) y O127:H<sup>-</sup> (*stx*<sub>2</sub>,*stx*<sub>2d</sub>).

**Tabla 2.6** - Distribución de los patotipos observados entre los diferentes serotipos de las 65 cepas detectadas mediante la hibridación colonial.

Patotipo	N	Serotipos	Patotipo	N	Serotipos
<i>stx<sub>2</sub></i>	3	<b>S8</b> -O146:H-, <b>S53</b> -O171:H2 <b>S68</b> -O89:H19	<i>stx<sub>1</sub>/stx<sub>2d</sub></i>	4	<b>S56</b> -O70:H- <b>S78</b> -166:H21 <b>S79-S133</b> -O90:H-
<i>stx<sub>2c</sub></i>	17	<b>S57-S58-S59-S62-S63-S64-S67</b> -O171:H2 <b>S72-S73</b> -O181:H20 <b>S74-S82-S85-S108-S113</b> -O171:H2, <b>S94</b> -O98:HNT <b>S96</b> -ONT:H- <b>S99</b> -ONT:HNT	<i>hlyA/stx<sub>2</sub></i>	1	<b>S109</b> -O113:H21
<i>stx<sub>2d</sub></i>	2	<b>S77-S119</b> -O90:H-	<i>hlyA/stx<sub>1</sub>/stx<sub>2c</sub></i>	1	<b>S126</b> -O22:H8
<i>stx<sub>2e</sub></i>	15	<b>S48</b> -ONT:H21, <b>S54</b> -O8:H9, <b>S75</b> -O2:H21, <b>S76</b> -O54:H21, <b>S80</b> -ONT:H9, <b>S120-S121</b> -O8:H9, <b>S138-S140-S141</b> -ONT:H- <b>S146</b> -O177:H-, <b>S147</b> -O159:H-, <b>S148</b> -O100:H-, <b>S149</b> -O8:H-, <b>S150</b> -O26:H-	<i>hlyA/stx<sub>1</sub>/stx<sub>2d</sub></i>	1	<b>S51</b> -O146:H21
<i>stx<sub>2g</sub></i>	8	<b>S86-S91-S93-S107-S134</b> -O2:H25 <b>S90</b> -O2:H2, <b>S98</b> -O136:H1 <b>S102</b> -O8:H31	<i>hlyA/stx<sub>1</sub>/stx<sub>2e</sub></i>	1	<b>S50</b> -O176:H16
<i>stx<sub>2</sub>/stx<sub>2c</sub></i>	2	<b>S70</b> -O162:H7, <b>S106</b> -O171:H2	<i>hlyA/stx<sub>2</sub>/stx<sub>2c</sub></i>	1	<b>S115</b> -O91:H21
<i>stx<sub>2</sub>/stx<sub>2d</sub></i>	1	<b>S55</b> -O127:H-	<i>hlyA/saa/stx<sub>2</sub></i>	3	<b>S124-S125</b> -O1:H20 <b>S69</b> -O181:H49
<i>stx<sub>2</sub>/stx<sub>2e</sub></i>	1	<b>S49</b> -O26:H-	<i>hlyA/saa/stx<sub>1</sub>/stx<sub>2c</sub></i>	2	<b>S114</b> -O22:H8 <b>S116</b> -O76:H2
<i>stx<sub>2c</sub>/stx<sub>2d</sub></i>	1	<b>S52</b> -O171:H2	<i>hlyA/eaeA/stx<sub>1</sub>/stx<sub>2c</sub></i>	1	<b>S110</b> -O157:H- ( <i>fliC<sub>H7</sub></i> +) )

**N**, número de cepas con el patotipo indicado.



## 2.4- Discusión

Los resultados obtenidos en este capítulo indican que el gen *stx*<sub>2</sub> está ampliamente distribuido en las bacterias presentes en las diferentes aguas residuales analizadas, tanto las de origen urbano como las procedentes de mataderos bovinos y porcinos, por lo menos en la zona geográfica analizada. Asimismo la presencia del gen *stx*<sub>2</sub> también fue confirmada en las bacterias aisladas de las heces de bovinos.

Además de esta amplia distribución, se observa una elevada diversidad en las cepas, no sólo en cuanto a las características bioquímicas, sino también en cuanto a la variedad de serotipos de *E. coli* en los que el gen *stx*<sub>2</sub> fue detectado. Esta diversidad es incluso mayor al comparar las cepas que fueron aisladas de cada origen diferente de las muestras. Así pues, con excepción del serotipo O171:H2, que fue identificado tanto en muestras de agua residual de origen humano como de agua residual de matadero bovino, ningún serotipo fue detectado en muestras de origen diferente. Si bien hay que tener en cuenta el número reducido de cepas analizadas de algunas de las muestras.

Hay que destacar que, en el caso de las cepas aisladas después de ser identificadas como portadoras del gen *stx*<sub>2</sub> tras la hibridación colonial, a pesar de haber utilizado un método selectivo para los coliformes totales (familia *Enterobacteriaceae*), el gen únicamente fue detectado en cepas identificadas como *E. coli*, bien sea mediante el Kit comercial API 20E o mediante la secuenciación del gen que codifica para el ARNr 16S en aquellas cepas que no mostraron una identificación clara mediante el kit API20E. Aunque la presencia del gen *stx*<sub>2</sub> ha sido descrita anteriormente en otros géneros bacterianos como *Citrobacter freundii* y *Enterobacter cloacae* (171, 141), la elevada carga microbiana presente en las muestras que fueron analizadas, habría podido enmascarar la detección de otros géneros diferentes de *E. coli* que se encontraran en proporciones menores. No obstante *E. coli* es la especie portadora del gen *stx*<sub>2</sub> predominante en estos ambientes.

Un ejemplo de no detección de grupos mayoritarios es la detección de *E. coli* O157:H7 utilizando un método selectivo (separación inmunomagnética seguida de siembra en agar CT-SMAC y inmunodetección colonial). Así pues,

mientras que el serotipo de *E. coli* O157:H7 únicamente se detectó en una de las muestras de agua residual de matadero bovino utilizando la técnica de la hibridación colonial, utilizando el método selectivo para la detección de este serotipo fue posible detectarlo en la mayoría de las muestras de agua residual de matadero bovino analizadas.

A pesar de ello, teniendo en cuenta los resultados obtenidos mediante las dos técnicas utilizadas (una no selectiva para ningún serotipo en concreto y una selectiva para el serotipo O157), se pone en evidencia que son mucho más frecuentes los otros serotipos portadores del gen *stx*<sub>2</sub> que el de *E. coli* O157:H7, tanto en muestras de agua residual urbana y de matadero porcino, en las que no se detectó este serotipo, como en las de matadero bovino, en las que a pesar de haber sido detectado, se detectó en una proporción menor, como indicaron los resultados del Capítulo 1.

De todo ello se concluye que en el agua residual del área geográfica estudiada, al igual que lo que ocurre en muestras de ganado vacuno y en otros alimentos (105, 159) el serotipo O157:H7 no es el serotipo más frecuentemente aislado de estas muestras que transporta el gen *stx*<sub>2</sub>, a pesar de este serotipo ha sido responsable de los brotes más importantes causados por cepas EHEC.

Se han aislado un total de 35 serotipos diferentes, 8 de los cuales no habían sido previamente descritos en el momento de la redacción de este trabajo (Anexo IV). Si bien estos serotipos se hallan asociados a un determinado tipo de muestras, el bajo número de cepas analizadas no permite establecer una relación estadísticamente significativa entre estos serotipos y sus posibles huéspedes. No obstante, según un estudio en el que se analizaba la presencia de serotipos STEC en diferentes especies de animales domésticos (gatos, perros, vacas, ovejas, cabras, cerdos y pollos) (18), se encontró un elevado número de serotipos STEC diferentes, distribuidos entre las diferentes especies animales.

Hay que destacar que, aparte del serotipo O157:H7, los serotipos O146:H21 (aislado de agua residual urbana), O113:H21 y ONT:H<sup>-</sup> (aislados de agua residual de matadero bovino), O91:H21 (aislado de heces de bovinos), y el O26:H<sup>-</sup> (aislado de muestras de agua residual de matadero porcino), han sido

asociados en algún caso con brotes o casos esporádicos de colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico (24). De hecho, los casos de enfermedad asociados al serotipo O113:H21 han aumentado en los últimos años (31).

En cuanto a las dos características bioquímicas utilizadas para la detección del serotipo O157:H7, ausencia de actividad  $\beta$ -D-glucuronidasa e incapacidad de fermentar el sorbitol en 24 h (175), todas aquellas cepas pertenecientes a este serotipo presentaron estas características. Por otro lado, la mayoría de cepas no-O157 presentaron las características típicas de *E. coli*, capaces de fermentar el sorbitol y con actividad  $\beta$ -D-glucuronidasa, aunque un grupo reducido de cepas presentaron resultados "atípicos" (5 no fermentadoras de sorbitol y 6 con ausencia de actividad  $\beta$ -D-glucuronidasa). No obstante, la existencia de cepas de *E. coli* que no presentan estas dos características bioquímicas ha sido previamente descrita en cepas de origen ambiental. Así pues, la proporción de cepas de *E. coli* presentes en las heces que no presentan dicha actividad oscila entre el 10 y el 20% (37), mientras que en cepas aisladas del medio ambiente la proporción de estas cepas aumenta hasta el 34% (177).

En relación con la resistencia a antibióticos, las sulfonamidas, tetraciclina, el cloranfenicol, el trimetoprim y la estreptomicina fueron los antibióticos a los que un mayor porcentaje de cepas se mostraron resistentes o parcialmente resistentes. Un 74% de las cepas se mostró resistente a uno o más antibióticos. Aunque este porcentaje es superior al observado por Khan (86), los antibióticos que mostraron un mayor número de resistencias en el estudio de Khan fueron la tetraciclina y la estreptomicina, dos de los antibióticos a los que las cepas aisladas en este estudio mostraron una elevada resistencia. Las diferencias en cuanto a los diferentes porcentajes obtenidos entre los dos estudios podrían atribuirse a diferencias geográficas. Por otro lado, en un estudio realizado en el Hospital de la Vall d'Hebrón (Barcelona, España) sobre la resistencia de cepas de *E. coli* aisladas de pacientes a diferentes antibióticos, se observó que los antibióticos con un mayor número de resistencias fueron la ampicilina, piperacilina, ácido nalidíxico, cotrimoxazol y tetraciclina (comunicación personal, Dr. Rosa Bartolomé, Hospital de la Vall de Hebrón, Barcelona). En nuestro estudio se observó resistencia para estos antibióticos, aunque el porcentaje de resistencia fue algo menor excepto en el caso de la tetraciclina, para el cual se observó un mayor porcentaje de cepas resistentes. Las diferencias entre los dos

estudios podrían ser debidas al menor número de cepas analizadas. No obstante, los porcentajes elevados de resistencias a antibióticos parece directamente relacionado con la utilización de los antibióticos o análogos de estos en los sistemas de crianza masiva, tanto para terapéutica como su uso indiscriminado en los alimentos.

Se detectó presencia del gen *stx*<sub>2</sub> en todas las cepas aisladas con la excepción de las cepas de *E. coli* O157 aisladas mediante el método de la separación inmunomagnética, seguido de la siembra en agar CT-SMAC y posterior detección inmunológica, que no eran portadoras del gen *fliC*<sub>H7</sub>. Así mismo, estas cepas no presentaron ningún otro de los factores de patogenicidad analizados que se discuten más adelante (el gen codificante para la intimina, la adhesina Saa y la enterohemolisina hemorrágica). Si bien no se ha realizado ningún estudio sobre cepas de *E. coli* O157 procedentes de agua residual urbana, en el caso del ganado porcino, Chapman *et al.* (1997) (38) consiguió aislar 4 cepas de *E. coli* O157 de un total de 1000 cerdos analizados. Todas ellas resultaron negativas para la presencia de genes *stx*, así como también para la presencia del gen *eaeA*. Sólo una resultó mótil pero no presentaba el antígeno H7. En otros estudios también se han conseguido aislar cepas de *E. coli* O157 de cerdos, tanto fermentadoras de sorbitol como no fermentadoras que podrían ser enterotóxicas (54). El gen *eaeA* no representa ningún marcador de virulencia en el ganado porcino ya que según se ha visto, las cepas STEC causantes de la enfermedad edematosa del cerdo utilizan un mecanismo de adherencia diferente del utilizado por la mayoría de cepas STEC, mediado por unas adhesinas fimbriadas denominadas F107, codificadas por el gen *fedA* (146).

En cuatro de las cepas portadoras del gen *stx*<sub>2</sub> se observó, sin embargo, la pérdida del gen *stx*<sub>2</sub> tras haber realizado un par de resiembras. Este hecho ya había sido descrito anteriormente en cepas de origen clínico (78, 145) y de origen animal (21).

La gran diversidad de serotipos observada coincide con una gran variabilidad en cuanto a las diferentes variantes del gen *stx*<sub>2</sub> presentes en estas cepas. Así pues, se detectaron cinco variantes diferentes correspondientes a los genes *stx*<sub>2r</sub>, *stx*<sub>2cr</sub>, *stx*<sub>2dr</sub>, *stx*<sub>2e</sub> y *stx*<sub>2g</sub>. Además, estas variantes se asociaron con cepas aisladas de un origen diferente, de manera que el gen *stx*<sub>2</sub> y el *stx*<sub>2d</sub> fueron

detectados principalmente en cepas aisladas de agua residual urbana, el gen *stx<sub>2</sub>*, *stx<sub>2c</sub>* y *stx<sub>2g</sub>* en muestras de agua residual de matadero y heces de bovinos y el gen *stx<sub>2e</sub>* fue detectado exclusivamente en cepas aisladas de agua residual de matadero porcino. Hay que destacar que todas las cepas pertenecientes al serotipo O157:H7 analizadas en este estudio eran portadoras de la variante *stx<sub>2c</sub>*. Los resultados coinciden con estudios previos sobre cepas aisladas de diferentes orígenes. Así pues, según estos estudios los serotipos aislados de vacas presentaron predominantemente el gen *stx<sub>2</sub>* y la variante *stx<sub>2c</sub>* (*stx<sub>2vha</sub>* y *stx<sub>2vhb</sub>*) (31), predominando ésta última en cepas pertenecientes al serotipo O157:H7 (124, 158). Por otro lado, las variantes *stx<sub>2e</sub>*, *stx<sub>2g</sub>* han sido aisladas hasta la fecha principalmente en el ganado porcino (109), y vacas (100), respectivamente. La variante *stx<sub>2f</sub>*, que no ha sido detectada en ninguna de las cepas analizadas, ha sido asociada, en estudios anteriores, a palomas (173), mientras que el gen *stx<sub>2d</sub>* ha sido asociado a serotipos aislados de ovejas (152).

En este estudio se encontraron diferentes combinaciones de variantes *stx<sub>2</sub>* en una misma cepa, lo cual podría estar asociado con un mayor grado de virulencia de las cepas. El primer estudio en el que se describió la presencia de más de un gen *stx<sub>2</sub>* fue el de Ito *et al.* (70), en el que una cepa de *E. coli* perteneciente al serotipo, presentaba los genes *vt2ha* y *vt2hb*, que según la nomenclatura utilizada actualmente corresponderían a dos subtipos de la variante *stx<sub>2c</sub>*. Estos resultados confirman estudios previos en los que se han descrito hasta un total de 3 variantes *stx<sub>2</sub>* en un mismo aislamiento (*stx<sub>2</sub>*, *stx<sub>2c</sub>* y *stx<sub>2d</sub>*) en cepas aisladas de ganado bovino (12).

Sin embargo, hay que señalar que en el caso de las cuatro cepas en las que se observó presencia de dos bandas que hibridaron con la sonda de 378 a pesar de haber sido detectada una sola variante del gen, estas bandas no pudieron ser secuenciadas por la proximidad entre ellas. Sería necesario utilizar técnicas de electroforesis en campo pulsante para poder separar los fragmentos e identificar los fragmentos positivos, aislarlos, purificarlos y secuenciarlos.

Un porcentaje de las cepas aisladas en este estudio eran portadoras, además, del gen *stx<sub>1</sub>*, siendo más frecuente en cepas de origen bovino (28% en agua residual y 20% en heces) que en las de agua residual urbana (11%), mientras que en agua residual de origen porcino no se detectó ninguna cepa

portadora de este gen. No obstante, hay que recordar el número reducido de cepas analizadas.

Destaca el pequeño porcentaje de cepas aisladas de agua residual urbana que, a pesar de ser portadoras del gen *stx<sub>2</sub>*, fueron capaces de producir la proteína *Stx<sub>2</sub>*, respecto a un elevado porcentaje de cepas aisladas de agua residual de matadero y heces de bovinos, en los que sí que se detectó producción de esta proteína. Una posible explicación a esta observación podría estar relacionada con el hecho de que estas cepas fueran capaces de producir la proteína pero en unas concentraciones inferiores al límite de detección del método que se sitúa alrededor de una colonia (139). En este caso, estas cepas, más que potencialmente patogénicas deberían considerarse como un posible reservorio del gen *stx<sub>2</sub>* en el medio ambiente, de manera que este gen podría transmitirse a otras cepas horizontalmente, y dependiendo de su lugar de inserción podría volverse a expresar. Tal como muestran los resultados del Capítulo 3, en el que se estudian los bacteriófagos portadores de este gen en estas bacterias, este fenómeno podría ser el responsable de que en una de las cepas en las que no se percibió producción de proteína *Stx<sub>2</sub>*, una vez fue transducido el bacteriófago a otra cepa, sí que se observó producción de proteína. La relación entre la inducción de los bacteriófagos portadores de estos genes y la producción de proteína también será objeto de estudio del Capítulo 3.

No obstante, tampoco se descarta que estos métodos inmunológicos para la detección de producción de proteína puedan presentar una mayor o menor afinidad para la detección de algunas variantes *Stx<sub>2</sub>*. Pequeñas alteraciones en la secuencia del gen podrían haber alterado el sitio de unión al anticuerpo de manera que la proteína no fuera reconocida con la misma afinidad. Sin embargo, a pesar de que los controles positivos de las diferentes variantes utilizados reaccionaron en mayor o menor medida con el reactivo, de las cepas analizadas únicamente aquellas que eran portadoras de las variantes *stx<sub>2</sub>*, *stx<sub>2c</sub>* y *stx<sub>2g</sub>* fueron identificadas como productoras de proteína *Stx<sub>2</sub>*.

En relación con la diferente producción de proteína, hay que añadir que otros estudios han evidenciado con anterioridad una variabilidad en cuanto a los títulos de producción de toxina por diferentes cepas (40).

El porcentaje de cepas portadoras del gen *stx*<sub>1</sub> en las que se detectó producción de proteína Stx<sub>1</sub> fue elevado, posiblemente relacionado con una menor variabilidad de este gen, en relación con las diversas variantes *stx*<sub>2</sub> descritas, que podrían haber dificultado su detección por el método utilizado. No obstante, como se ha comentado anteriormente, los diferentes controles utilizados sí que mostraron señal positiva con el método de detección de proteína utilizado.

El gen *eaeA* fue detectado únicamente en las cepas de *E. coli* pertenecientes al serotipo O157:H7. Algunos estudios han descrito una asociación entre la infección por cepas STEC y la presencia del gen *eaeA* (220, 27). De hecho este gen ha sido asociado a casos severos de enfermedad sobre todo en individuos jóvenes (22). No obstante, se han descrito casos esporádicos de síndrome urémico hemolítico que han sido asociados a cepas LEE-negativas pertenecientes a los serotipos de *E. coli* O104:H21 y O113:H21, en Estados Unidos y Australia, respectivamente (98, 144). La existencia de estas cepas sugiere la existencia de otros factores de virulencia implicados en la adherencia de las bacterias al epitelio intestinal. En el caso de una cepa de *E. coli* O86:H<sup>-</sup> aislada en Japón (71) negativa para la presencia del gen *eae*, presentaba el patrón de adherencia característico de las cepas de *E. coli* enteroagregativas.

El gen *saa* fue detectado en cinco cepas aisladas de agua residual de matadero y heces de bovinos, pertenecientes a los serotipos O1:H20 (2 cepas), O22:H8, O76:H2 y O113:H21. De todos estos serotipos únicamente O22:H8 y el O113:H21 han sido descritos como portadores del gen *saa* en otros estudios. De hecho este gen fue descrito inicialmente en una cepa del serotipo O113:H21 (144), aunque posteriormente también se ha detectado en otros serotipos (73). No obstante, por los datos obtenidos en este y otros estudios este gen parece asociado a serotipos aislados de ganado vacuno (142, 25).

En referencia al gen que codifica para la enterohemolisina enterohemorrágica, éste fue detectado tanto en cepas aisladas de agua residual urbana como en cepas de origen bovino, en el 7% y 46% de las cepas, respectivamente.

En resumen, de todas las cepas analizadas en este estudio, aparte de poseer los genes codificantes para el gen *stx*<sub>2</sub>, que fue el criterio de selección de estas cepas, una mayoría no era portadora de ninguno de los otros factores de virulencia que más frecuente han sido asociados a enfermedad en humanos, por lo que potencialmente no serían cepas patógenas. Hay que recordar, sin embargo, que el objetivo de este estudio fue la detección de cepas STEC portadoras del gen *stx*<sub>2</sub> independientemente de su poder patogénico, para lo cual se hubieran utilizado métodos selectivos para unos determinados serotipos. Las únicas cepas que presentaron todos los factores de virulencia fueron las del serotipo O157:H7, la mayoría de las cuales fueron aisladas de agua residual de matadero bovino. Estos datos reflejan la situación epidemiológica de nuestra área geográfica, donde en los años de realización de este trabajo únicamente tuvo lugar un brote originado por cepas STEC y que además fue atribuido a una cepa de *E. coli* O157:H7.

No obstante, hay que destacar la elevada combinación de genes de virulencia que se observó en el resto de cepas STEC no O157. El hecho de que en algunos casos el mismo serotipo mostrara una diferente combinación de genes, sugiere que los genes que codifican para los factores de virulencia analizados, se están moviendo entre las diferentes bacterias. Así pues estas cepas podrían ser importantes para la emergencia de nuevos serotipos virulentos y de hecho, estas cepas podrían representar estadios intermedios en la emergencia de nuevos patógenos, que aflorarían como cepas patógenas con la adquisición de otros factores de virulencia, a lo cual podrían contribuir elementos genéticos móviles como bacteriófagos, plásmidos y transposones. Dicho fenómeno de adquisición de genes de virulencia ya se ha evidenciado con la difusión de los genes *stx* entre una gran variedad de serotipos de *E. coli* (ver Anexo IV) extendiéndose, incluso, a otras especies, como ya se ha indicado.

No obstante, como se ha indicado anteriormente, para que una cepa produzca enfermedad, además de poseer estos factores de virulencia, debe cumplir otras características igualmente importantes, como la resistencia a pH ácidos, para poder superar la barrera gástrica y ser capaz de competir con el resto de bacterias presentes en el intestino.

## CAPÍTULO 3

---

*"Diversidad de bacteriófagos portadores del gen stx<sub>2</sub>"*



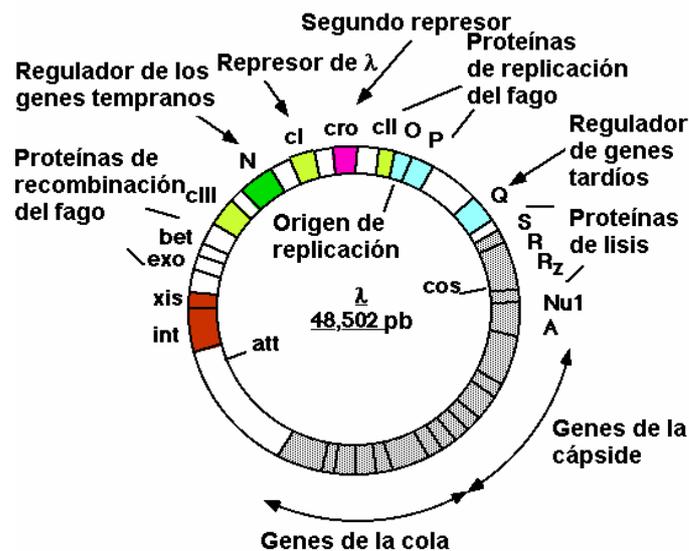
### 3.1- Introducción

Las bacterias se caracterizan por su enorme diversidad genotípica y fenotípica que les confiere una gran adaptabilidad a su entorno. A esta extraordinaria diversidad fenotípica ha contribuido la existencia de ciertos elementos genéticos móviles como los bacteriófagos, los plásmidos y los transposones, capaces de transmitir un carácter entre diferentes individuos de una población, lo que se conoce como transmisión horizontal o lateral. Gracias a estos elementos las bacterias son capaces de adaptarse rápidamente ante una determinada presión selectiva, produciéndose al mismo tiempo una diversificación entre las poblaciones (134). La importancia de la transmisión horizontal de genes mediante estos elementos genéticos se puso de manifiesto en los años 60, cuando se produjo la emergencia de numerosos patógenos resistentes a antibióticos (151, 48). Así mismo, hay que destacar el elevado número de factores patogénicos capaces de ser transmitidos mediante estos elementos móviles como lo son algunas enterotoxinas de *E. coli* codificadas en plásmidos y transposones, o diversas toxinas codificadas en bacteriófagos, entre otros.

Existe una clase de bacteriófagos capaces de integrarse en el genoma bacteriano y permanecer por tiempo indefinido en él en forma latente como profago. Se conocen como bacteriófagos atemperados. Cuando estos bacteriófagos infectan una bacteria pueden seguir dos ciclos diferentes, el ciclo lítico o el cíclico lisogénico, en función de los estímulos recibidos. Para que se produzca el ciclo lítico es necesario que se traduzcan los genes estructurales del fago. En cambio, el ciclo lisogénico se produce gracias a la traducción de unos genes reguladores presentes en el genoma del bacteriófago, de manera que si se mantienen niveles adecuados de una proteína represora no se traducen los genes estructurales y el bacteriófago queda integrado en el cromosoma bacteriano. Sin embargo, ante diferentes estímulos que puedan afectar a la integridad del fago, se puede inducir el ciclo lítico, con la consiguiente liberación de miles de partículas víricas que serán capaces de infectar nuevas bacterias. A parte de los genes reguladores y estructurales, estos bacteriófagos pueden llevar integrados otros genes que pueden conferir alguna ventaja selectiva a las bacterias, como genes de resistencia a antibióticos o factores de virulencia como

toxinas. Un ejemplo de bacteriófago atemperado es el bacteriófago  $\lambda$ . En la **Figura 3.1** se muestra un esquema de su organización genética.

**Fig. 3.1-** Genoma del bacteriófago lambda



Dentro del grupo de toxinas codificadas en el genoma de bacteriófagos se encuentra la toxina eritrogénica de *Streptococcus pyogenes* (210), las enterotoxinas A, D, E y la toxina 1 del síndrome del shock tóxico (TSST-1) de *Staphylococcus aureus* (13), las neurotoxinas C, D y E de *Clostridium botulinum* (188), la toxina diftérica de *Corynebacterium diphtheriae* (97), la enterotoxina de *Vibrio cholerae* (203) y las toxinas Shiga de *Shigella dysenteriae* y *Escherichia coli* (19, 133).

Como se ha descrito en el capítulo anterior, las diferentes variantes de los genes *stx*, que codifican las diferentes toxinas Shiga (*stx*<sub>1</sub>, *stx*<sub>2</sub>, *stx*<sub>2c</sub>, *stx*<sub>2d</sub>, *stx*<sub>2e</sub> y *stx*<sub>2f</sub>) se hallan integrados en el genoma de bacteriófagos atemperados (133, 176, 187, 122, 192). Aunque no hay datos publicados en cuanto a la variante *stx*<sub>2g</sub> recientemente descrita, según el presente estudio, también estaría asociado a la presencia de un bacteriófago atemperado.

Estos bacteriófagos se hallan presentes de forma habitual en el medio ambiente (120, 123). De hecho, se ha visto que son muy resistentes en estos

entornos, de manera que el medio ambiente podría actuar como un reservorio importante para estos bacteriófagos (121). Además, los bacteriófagos libres podrían ser capaces de infectar cepas no lisogénicas (para estos bacteriófagos) favoreciendo así la dispersión de los genes *stx* entre las diferentes poblaciones. Del mismo modo, cuando se inducen los bacteriófagos presentes en las cepas bacterianas lisogénicas para estos fagos se liberan grandes cantidades de partículas víricas que a su vez podrían infectar a nuevas bacterias.

Así pues, en estudios de transducción realizados *in vivo* e *in vitro* con algunos de estos fagos, se observó que podían transmitir la capacidad toxinogénica a bacterias que antes no la tenían (2, 168), poniendo de manifiesto la importancia de estos fagos en el mantenimiento y la transferencia horizontal de los genes *stx* a diferentes poblaciones de *E. coli*, con la consiguiente emergencia de nuevos serotipos STEC.

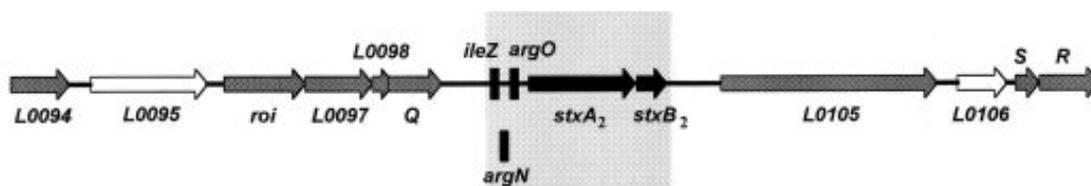
Además de la capacidad mencionada en el párrafo anterior, los bacteriófagos también podrían tener un papel directo importante en la patogénesis. En muchas ocasiones se ha observado que, la producción de toxina está asociada con la inducción del ciclo lítico del bacteriófago (118, 201). Este mecanismo, en el que se acopla la inducción del fago con la producción de toxina, hace posible que se multiplique su efecto tóxico en el transcurso de una infección. En un estudio reciente se ha sugerido que los fagos liberados en el intestino en una infección por cepas STEC podrían ser capaces de infectar bacterias no STEC presentes en el intestino que, a su vez, contribuirían a la producción de toxina (52), lo que aumentaría el riesgo de un agravamiento de la infección.

Se han descrito diversos mecanismos capaces de provocar la inducción del ciclo lítico de estos fagos con la consiguiente liberación de los mismos, siendo el tratamiento con mitomicina (agente alquilante del ADN) y la irradiación con luz UV los más frecuentemente utilizados en investigación (136). Seguido a esta inducción generalmente se observa un incremento en la producción de toxina, seguramente por la transcripción de los genes del fago. Este efecto ha sido observado también con el tratamiento mediante algunos antibióticos, por lo que la utilización de ciertos antibióticos que afectan el ADN para la terapia contra

infecciones provocadas por STEC está desaconsejada (216, 92). Tanto la irradiación con luz UV como el tratamiento con estos antibióticos actúan induciendo la respuesta SOS, provocando un aumento en la expresión de los genes fágicos que anteriormente estaban silenciados, a través de la activación de la proteína RecA que, mediante su actividad proteasa, degradará la proteína represora del ciclo lítico del fago. Algunos antibióticos en los que se ha observado inducción de la respuesta SOS incluyen quinolonas, trimetoprim, furazolidona y algunos antibióticos  $\beta$ -lactámicos como amoxicilina, cefuroxano y ceftriaxano, mientras que otros, como la fosfomicina, los aminoglicósidos, las tetraciclinas, los macrólidos y el imipinem son inefectivos para *E. coli* O157:H7 (218, 89).

Los fagos portadores de toxinas shiga tienen una estructura genética similar al bacteriófago lambda (ver **Figura 3.1**), perteneciente a la familia *Siphoviridae*, por lo que frecuentemente se denominan bacteriófagos lambdoides. El genoma de estos bacteriófagos incluye alrededor de 50 genes. Algunos de estos bacteriófagos han sido total o parcialmente secuenciados (198, 74, 79, 122, 127, 150, 164-166, 180, 202, 208, 209, 219). En estos fagos se reconoce una región reguladora, donde se codifica el gen Q (gen regulador de los genes tardíos) y en una posición posterior a este gen se encuentra codificada la toxina en dos pautas de lectura abierta que codificarán para las dos subunidades (**Figura 3.2**). A continuación se localizan los genes implicados en la lisis, el gen S (codificante para una holina, que provoca daños a la membrana citoplasmática necesarios para que R pueda ejercer su función) y el gen R (implicado en la degradación del peptidoglucano de la pared). Además de esta estructura genética similar al bacteriófago lambda (162), algunos bacteriófagos portadores del gen *stx* utilizan el mismo receptor que el bacteriófago lambda (la proteína LamB) para infectar a la cepa huésped (209).

**Fig. 3.2** - Localización de los genes *stx* en el genoma del bacteriófago 933W



Localización de las dos pautas de lectura abierta (*stxA<sub>2</sub>* y *stxB<sub>2</sub>*) a continuación del gen *Q*, implicado en la regulación de los genes tardíos (*S* y *R*) de los bacteriófagos lambdoides

Fuente: <http://iai.asm.org/content/vol68/issue9/images/large/ii0900057003>

En cuanto al sitio de integración que utilizan algunos de estos bacteriófagos para integrarse en el cromosoma bacteriano, en las dos cepas de *E. coli* O157 secuenciadas, el gen *stx<sub>1</sub>* se encuentra integrado en el locus *yehV*, flanqueado por duplicaciones de CCCTGTCACGTTACGCGCGTG (219), mientras que el gen *stx<sub>2</sub>* se halla integrado en el locus *wrbA*, flanqueado por duplicaciones de GACATATTGAAAC (107, 150).

Rietra *et al.* (156), basándose en el tamaño del ADN de los bacteriófagos aislados, los patrones de restricción obtenidos al tratar el ADN con endonucleasas (*restriction fragment length polymorphism*, RFLP) y en la hibridación ADN-ADN, no observó grandes diferencias en los perfiles obtenidos en bacteriófagos inducidos de cepas de *E. coli* O157:H7 de origen humano, sugiriendo que los fagos portadores de toxinas shiga estaban muy relacionados genéticamente. Sin embargo, otros autores han demostrado la existencia de diferencias apreciables en el tamaño de los fragmentos digeridos del fago que hibridan con sondas específicas para los genes *stx* sugiriendo una posible heterogeneidad de los fagos que lisogenizan las cepas huésped (158, 42). En un estudio realizado con 27 cepas de *E. coli* O157:H7, en aquellas que tenían el mismo patrón en la electroforesis en campo pulsante (*pulsed field gel electrophoresis*, PFGE) Osawa *et al.* (136) observaron el mismo patrón de restricción en el ADN de los bacteriófagos. En cambio, en cepas con diferente patrón en la PFGE se observaron diferencias en cuanto al ADN del bacteriófago. Un hecho curioso es que en algunas ocasiones en diferentes colonias de una misma cepa se observaban diferencias al analizar los patrones de restricción. Este hecho, conocido como *clonal turnover* es debido a recombinaciones

genéticas que tienen lugar dentro de la célula huésped por la elevada presencia de genes de otros bacteriófagos atemperados. Así, la secuenciación de la cepa de *E. coli* O157:H7 implicada en el brote de Sakai (Japón) en el año 1996 reveló la presencia de al menos 10 bacteriófagos lambdoides en el genoma de esta bacteria.

Esta heterogeneidad genética se ha visto reflejada en las diferentes morfologías observadas al microscopio electrónico. Así pues, se han descrito bacteriófagos portadores del gen *stx*<sub>2</sub> similares al bacteriófago lambda con cápsides icosaédricas de simetría hexagonal y cola larga, otros que presentan cápsides alargadas con simetría hexagonal y colas no contráctiles (119). Rietra *et al.* (156) describió diferentes tipos de bacteriófagos. Los bacteriófagos codificantes para las *Stx*<sub>1</sub> y *Stx*<sub>2</sub> que infectaban cepas de *E. coli* O157:H7 presentaban cápsides regulares icosaédricas con capsómeros de simetría hexagonal y colas cortas, mientras que otros bacteriófagos codificantes para la *Stx*<sub>1</sub> procedentes de cepas de *E. coli* O26 presentaban cápsides alargadas con colas largas (bacteriófago H19). Este último bacteriófago, denominado H19, era muy similar al 933J obtenido de una cepa de *E. coli* descrito previamente por O'Brien *et al.* (1984). Asimismo, la cepa de *E. coli* O157:H7 asociada con el brote que tuvo lugar en Barcelona en el año 2001, presentaba dos bacteriófagos portadores del gen *stx*<sub>2</sub> con morfología diferente (119).

La mayor parte de los estudios realizados sobre diversidad genética y morfológica de bacteriófagos portadores del gen *stx*<sub>2</sub> han sido realizados a partir de cepas de *E. coli* O157:H7, la mayoría de las cuales habían sido implicadas en algún brote, o de bacteriófagos libres en el medio ambiente (123). Sin embargo, se desconocen las características de los bacteriófagos que se encuentran lisogenizados en cepas aisladas en el medio ambiente, no asociadas a patogénesis, las cuales podrían constituir un reservorio importante de los genes *stx* para la emergencia, en un futuro, de nuevos serotipos STEC virulentos. El análisis de estos bacteriófagos podría aportar información acerca del movimiento de estos genes en el ambiente y así entender la amplia dispersión del gen *stx* que se ha evidenciado en las últimas dos décadas.

### 3.1.1. Objetivos

Los objetivos de este capítulo se han centrado, pues, en el análisis de la diversidad de los bacteriófagos de las cepas lisogénicas aisladas del medio ambiente mediante los métodos descritos en el Capítulo 1. Este análisis se ha estructurado en los siguientes apartados:

- 1.- Estudio de la presencia de bacteriófagos inducibles en las diferentes cepas STEC aisladas de aguas residuales.
- 2.- Análisis genético del ADN de los bacteriófagos portadores del gen *stx*<sub>2</sub> mediante RFLP y PCR para las diferentes variantes del gen *stx*<sub>2</sub>.
- 3.- Análisis morfológico de los bacteriófagos al microscopio electrónico de transmisión.
- 4.- Análisis de su capacidad infectiva y estudio de la transmisión del carácter toxinogénico a diferentes cepas huésped *in vitro*.



## 3.2. Materiales y métodos

### 3.2.1. Cepas bacterianas y materiales de cultivo utilizados

En este capítulo se analizan los bacteriófagos presentes en las cepas portadoras del gen *stx*<sub>2</sub> aisladas en el Capítulo 1 y que fueron seleccionadas como cepas representativas basándose en los estudios realizados en el Capítulo 2. Así pues, estas cepas incluyen tanto las cepas que fueron aisladas mediante la hibridación colonial con la sonda *stx*<sub>2</sub>, como también las que fueron aisladas selectivamente pertenecientes al serotipo O157:H7 y que eran portadoras del gen *stx*<sub>2</sub>. En resumen, se analizó la presencia de bacteriófagos en un total de 79 cepas STEC.

La cepa de laboratorio *E. coli* C600 (933W), que tiene integrado el bacteriófago 933W en el cromosoma bacteriano en forma de profago (118), fue utilizada como control positivo en todos los experimentos de inducción de bacteriófagos y obtención de los lisados fágicos. Este bacteriófago fue uno de los primeros bacteriófagos codificantes para el gen *stx*<sub>2</sub> descritos (133).

Como control negativo se utilizó la cepa de laboratorio *E. coli* C600, que no tiene insertado ningún bacteriófago portador del gen *stx*<sub>2</sub>.

Las cepas utilizadas como huésped en los ensayos de infectividad de los bacteriófagos portadores del gen *stx*<sub>2</sub> fueron la cepa de *E. coli* O157:H7 (ATCC 43888), dos cepas de *E. coli* O157 obtenidas de los aislamientos de agua residual de matadero descritos en el Capítulo 1 (cepas 11 y 44), las cepas de laboratorio *E. coli* DH5 $\alpha$ , *E. coli* C600, *Enterobacter aerogenes* (ATTC 13048), una cepa de *Citrobacter freundii* aislada del medio ambiente y las siguientes cepas procedentes de aislamientos clínicos\*: *Shigella dysenteriae* (cepa 500H), *Shigella boydii* (cepas 316 y 351), *Shigella sonnei* (cepas 635 y 866), *Shigella flexnery* (cepas 668 y 805), *E. coli* O26 (cepas 216 y 224), *E. coli* O111 (cepa 209). Ninguna de estas cepas produce ni posee los genes para la producción de Stx<sub>2</sub>.

\*Estas cepas fueron amablemente cedidas por el Dr. Guillem Prats (Sección de Microbiología, Hospital de la Vall d'Hebrón, Barcelona).

Los medios utilizados para la propagación y el mantenimiento de estas cepas fueron el caldo de cultivo LB (Luria Bertani) y el agar LB.

### **3.2.2. Determinación de la presencia de bacteriófagos en las cepas STEC aisladas**

La presencia de bacteriófagos en las cepas STEC aisladas fue determinada mediante la inducción del ciclo lítico de los bacteriófagos, seguida de una purificación parcial de los lisados fágicos y la extracción del ADN perteneciente a la fracción fágica. La presencia de bacteriófagos portadores del gen *stx<sub>2</sub>* en la fracción fágica de los lisados fue comprobada mediante la detección del fragmento de 378 pb de la subunidad A del gen *stx<sub>2</sub>*, en el ADN extraído, tal como se indica a continuación. Por una mayor comodidad de ahora en adelante nos referiremos a la fracción fágica parcialmente purificada de los lisados fágicos como bacteriófagos inducidos.

#### **3.2.2.1. Inducción del ciclo lítico de los bacteriófagos**

El ciclo lítico de los bacteriófagos fue inducido mediante el tratamiento con mitomicina C (118). Para ello se prepararon cultivos de 200 ml de cada una de las cepas STEC a analizar, en LB modificado con 5 mM de CaCl<sub>2</sub> y se siguió el método descrito en el apartado de Materiales y Métodos generales (Anexo III).

En aquellos casos en los que no se consiguió obtener suficiente inducción de bacteriófagos como para ser detectados con las técnicas que se describen a continuación, se optó por ensayar volúmenes mayores, aunque no se consiguieron mejorar los resultados.

##### **3.2.2.1.1. Comprobación del nivel de inducción de los bacteriófagos**

La inducción del ciclo lítico de los bacteriófagos presentes en estas cepas fue valorada mediante la lectura de la absorbancia del cultivo al que se le había realizado el tratamiento con mitomicina C, a una longitud de onda de 600 nm. El

valor obtenido fue comparado con el valor de absorbancia obtenido a la misma longitud de onda, de un cultivo que no había sido inducido.

#### **3.2.2.2. Purificación parcial de los bacteriófagos**

Tras la inducción, los cultivos se filtraron utilizando filtros de 0,22  $\mu\text{m}$  de baja adsorción proteica (MillexTM- GP, Millipore, Mosheim, Francia), de poliéter sulfona, que según el fabricante permite separar la fracción correspondiente a los bacteriófagos de los restos celulares y evitan la adsorción de los bacteriófagos a los filtros. A continuación, se procedió con el método descrito en el apartado de Materiales y Métodos generales (Anexo III), para concentrarlos en un volumen final de 2 ml.

#### **3.2.2.3. Extracción de ADN de los bacteriófagos inducidos**

La extracción de ADN de los bacteriófagos inducidos se realizó siguiendo el método descrito en el apartado de Materiales y Métodos generales (Anexo III).

A continuación, se analizó un volumen de 5  $\mu\text{l}$  de la extracción de ADN mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0,8% en TBE 1x y se visualizó la banda correspondiente, tal como se indica en el apartado de Materiales y Métodos generales (Anexo III).

#### **3.2.2.4. Detección molecular del gen *stx*<sub>2</sub> en el ADN de los bacteriófagos inducidos mediante PCR**

La presencia del gen *stx*<sub>2</sub> en el ADN extraído de los bacteriófagos inducidos fue analizada mediante PCR, utilizando los cebadores y condiciones de PCR descritos en el Capítulo 1. En este caso, como ADN molde se utilizaron 4  $\mu\text{l}$  de una dilución 1/50 del ADN extraído de los bacteriófagos inducidos.

El amplímero fue visualizado en un gel de agarosa al 1,5%, realizado tal como se indica en el apartado de Materiales y Métodos generales (Anexo III).

### **3.2.2.5. Detección de bacteriófagos codificantes para variantes del gen *stx*<sub>2</sub>**

A fin de determinar si aquellas cepas STEC, en las que se había observado la presencia de más de una variante del gen *stx*<sub>2</sub>, presentaban bacteriófagos codificantes para cada una de las variantes detectadas, se realizó una PCR para cada una de las variantes (*stx*<sub>2</sub>, *stx*<sub>2c</sub>, *stx*<sub>2d</sub>, *stx*<sub>2e</sub>, *stx*<sub>2g</sub>), utilizando los cebadores y condiciones de PCR indicados en el Capítulo 2. Como ADN molde, igual que en el caso anterior, se utilizaron 4 µl de una dilución 1/50 del ADN extraído de los bacteriófagos.

### **3.2.3. Estudio de la diversidad genética de los bacteriófagos inducidos**

#### **3.2.3.1. Análisis del patrón RFLP del ADN**

Se realizó una digestión del ADN extraído de los bacteriófagos inducidos utilizando el enzima de restricción *EcoRI* (Promega, Madison (Wisconsin), Estados Unidos). Las condiciones y los reactivos utilizados en esta digestión se indican en el apartado de Materiales y Métodos generales (Anexo III).

Los patrones de restricción obtenidos (RFLP, *restriction fragment length polymorphism*) se visualizaron, mediante una electroforesis a un voltaje de 50 V durante 12 h, en un gel de agarosa al 0,8% en TBE 1X, tal como se describe en el apartado de Materiales y Métodos generales (Anexo III). Alternativamente, se utilizó otro enzima de restricción *ClaI*, en algunos casos en los que no se consiguió visualizar nítidamente la digestión del ADN con *EcoRI*.

#### **3.2.3.2. Localización del gen *stx*<sub>2</sub>**

Cualquier bacteriófago que estuviera integrado en el cromosoma de estas cepas podría haber sido inducido y purificado, sin que necesariamente correspondiera a un bacteriófago portador del gen *stx*<sub>2</sub>.

Con el fin de confirmar que el patrón de ADN obtenido correspondía a bacteriófagos portadores del gen *stx*<sub>2</sub> se realizó un "Southern blot" mediante la transferencia de los fragmentos de la digestión enzimática del ADN a membranas de nylon (Hybond N<sup>+</sup>, Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, Inglaterra), seguida de una hibridación con la sonda de 378 pb descrita en el Capítulo 1.

Para la transferencia se utilizó el sistema de transferencia por capilaridad, según se indica en el apartado de Materiales y Métodos generales (Anexo III).

Una vez transferido el ADN a la membrana, se dejó secar al aire y se procedió a la fijación de los ácidos nucleicos mediante luz UV, tal como se describe en el apartado de Materiales y Métodos generales.

La membrana fue posteriormente prehibridada e hibridada con la sonda de 378 pb marcada con digoxigenina, del mismo modo que se describió en el apartado 1.2.5.1 (Capítulo 1).

La región de ADN codificante para la subunidad A, que es reconocida por la sonda de 378 pb, no presenta diana de restricción para ninguno de estos enzimas de restricción, según se comprobó con algunas de las secuencias del gen *stx*<sub>2</sub> depositadas en la base de datos del GenBank y EMBL correspondientes a cada una de las variantes del gen *stx*<sub>2</sub> (M29153, X07865, M59432, M36727, AF043627, AY286000), por lo que se esperaba obtener una banda positiva en la hibridación, siempre que el gen *stx*<sub>2</sub> estuviera presente en un único bacteriófago y que, además, este bacteriófago codificase para el gen *stx*<sub>2</sub>. La suma del peso molecular de los diferentes fragmentos de restricción obtenidos se utilizó para comprobar la presencia de uno o más bacteriófagos inducibles o, en el caso de presentar más de un bacteriófago con niveles de inducción diferentes, el bacteriófago mayoritario.

Las diferencias observadas, en relación con el tamaño de la banda que resultó positiva en la hibridación, fueron atribuidas a diferencias en la secuencia del genoma de los bacteriófagos.

### **3.2.4. Estudio de la capacidad infectiva de los bacteriófagos inducidos**

#### **3.2.4.1. Análisis del espectro de huéspedes**

Tal como se ha indicado en la introducción, los bacteriófagos *stx*<sub>2</sub> aislados de una determinada cepa son capaces de infectar y lisogenizar nuevas bacterias pudiendo transmitir, así, la capacidad de producir toxina entre los individuos de una población.

Mediante la realización de este ensayo se pretendió analizar el espectro de huéspedes de estos bacteriófagos, utilizando como bacterias huésped las cepas de *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Shigella boydii*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes* y *Citrobacter freundii*, descritas en el apartado 3.2.1.

La metodología seguida para la inducción y purificación de los bacteriófagos presentes en las cepas STEC fue la misma que la descrita anteriormente. Una vez obtenida la suspensión fágica, se depositaron 10 µl de la correspondiente suspensión sobre una placa de agar LB con una doble capa de agar semi-sólido, con la cepa huésped objeto del análisis, preparada de la siguiente manera:

- 1) Se realizó un cultivo en LB de la cepa huésped a partir de un crecimiento en placa de 24 h y se incubó a 37 °C y agitación, hasta alcanzar una  $DO_{600nm} = 0,3$
- 2) Se transfirieron 0,5 ml de este cultivo a 2,5 ml de agar LB semi-sólido modificado con 5 mM de CaCl<sub>2</sub> y se agitó con un vórtex.
- 3) Esta mezcla se utilizó para preparar una doble capa de agar, sobre una placa de agar LB (preparada tal como se describe en el apartado de Materiales y Métodos generales (Anexo III) y se dejó secar.

- 4) A continuación, se depositó una gota de 10  $\mu$ l de la suspensión fágica, se dejó que se absorbiera en el agar y, seguidamente, se incubaron las placas a 37 °C durante 24 h.

#### **3.2.4.1.1. Detección de bacteriófagos en las cepas huésped**

Se analizó visualmente la aparición de zonas de lisis (más o menos translúcidas) sobre las cepas huésped estudiadas. La aparición de cualquier tipo de calva fue asociada con la presencia de bacteriófagos en las suspensiones fágicas analizadas, aunque como será analizado en la Discusión, la mayoría de bacteriófagos *stx* producen zonas de lisis muy poco translúcidas, apenas perceptibles a simple vista.

#### **3.2.4.1.2. Comprobación de la presencia de bacteriófagos *stx*<sub>2</sub> en las zonas de lisis observadas**

Cualquier bacteriófago presente en las cepas STEC analizadas, que fuera capaz de infectar las cepas huésped utilizadas, hubiera podido provocar una zona de lisis o entrar en lisogenia, por lo que se realizó la comprobación de la presencia del gen *stx*<sub>2</sub> en las zonas de lisis mediante la transferencia de los bacteriófagos que estuvieran presentes en las zonas de lisis a membranas de nylon (Hybond N<sup>+</sup>, Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, Inglaterra). Las membranas fueron procesadas por "Plaque blot" tal como se describe en el apartado de Materiales y Métodos generales (Anexo III) y, a continuación, se realizó una hibridación del ADN de los bacteriófagos con la sonda descrita en el Capítulo 1, de acuerdo con la metodología descrita en el apartado de Materiales y Métodos generales (Anexo III).

#### **3.2.5. Obtención de transductantes *in vitro***

Se comprobó la capacidad, de los bacteriófagos *stx*<sub>2</sub> parcialmente purificados y que infectaban alguna de las cepas huésped utilizadas en el experimento anterior, de establecer el ciclo lisogénico, quedando integrado de forma estable en el cromosoma bacteriano en forma de profago, habiendo transmitido a la cepa receptora el gen *stx*<sub>2</sub> y la capacidad de producir toxina.

La metodología empleada para seleccionar los posibles transductantes se detalla en el apartado de Materiales y Métodos generales (Anexo III).

#### **3.2.5.1. Comprobación de la presencia del gen *stx*<sub>2</sub> en las cepas transductantes**

La presencia del gen *stx*<sub>2</sub> en las cepas huésped transductantes fue comprobada mediante la amplificación del fragmento de 378 pb del gen *stx*<sub>2</sub>, utilizando los cebadores y condiciones de PCR descritos en el Capítulo 1.

Se analizaron 5 µl del producto de la PCR mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1,5% en TBE 1x, tal como se describe en el apartado de Materiales y Métodos generales (Anexo III).

#### **3.2.5.2. Inducción del ciclo lítico de los bacteriófagos en las cepas transductantes**

Se comprobó la integridad y funcionalidad de los bacteriófagos transducidos mediante la inducción del ciclo lítico en las cepas transductantes, utilizando la misma metodología descrita anteriormente.

##### **3.2.5.2.1. Comprobación del nivel de inducción en las cepas transductantes**

Se analizó si el bacteriófago transducido en la nueva cepa huésped mantenía el mismo nivel de inducción que tenía en la cepa STEC original, utilizando la metodología indicada anteriormente.

##### **3.2.5.2.2. Purificación de los bacteriófagos**

Los bacteriófagos inducidos de las cepas transductantes fueron parcialmente purificados, su ADN extraído y analizado mediante RFLP, tal como se describe anteriormente.

### **3.2.5.2.3. Comparación del patrón RFLP del ADN de los bacteriófagos transducidos respecto al inducido de la cepa STEC original**

Se comparó el patrón de los bacteriófagos transducidos, respecto a los bacteriófagos inducidos de las cepas STEC iniciales.

### **3.2.5.2.4. Estudio de la funcionalidad del gen *stx*<sub>2</sub>**

Con el fin de confirmar de confirmar si el gen *stx*<sub>2</sub> de los bacteriófagos transducidos seguía siendo funcional, se realizó el análisis de producción de proteína *Stx*<sub>2</sub> utilizando el kit comercial Duopath® Verotoxin (Merck, Darmstadt, Alemania) en las cepas transductantes, según se indica en el apartado de Materiales y Métodos generales (Anexo III).

### **3.2.6. Análisis del locus de inserción de los bacteriófagos**

Con el fin de determinar si los bacteriófagos presentes en las cepas STEC aisladas ocupaban los mismos loci de inserción que los profagos identificados en las cepas de *E. coli* O157:H7 secuenciadas, *yehV* y *wrbA*, que codifican dos proteínas reguladoras, se analizó si estos loci estaban ocupados o intactos mediante la técnica de la PCR. Para ello se utilizaron los cebadores descritos por (178) que amplifican los extremos de unión entre el profago y el cromosoma bacteriano (*attachment site junctions*). Así pues, si el locus se encontraba ocupado se esperaba amplificación en los dos extremos, mientras que si no estaba ocupado se esperaba lo contrario. Los cebadores utilizados fueron los siguientes:

Cebador	Secuencia nucleotídica del cebador (5'→3')	locus	sitio de unión (attachment junction)	tamaño del amplímero esperado (pb)
A E	AAGTGGCGTTGCTTTGTGAT GATGCACAATAGGCACTACGC	<i>yehV</i>	derecho	702
F B	CACCGGAAGGACAATTCATC AACAGATGTGTGGTGAGTGTCTG	<i>yehV</i>	izquierdo	824
C G	AGGAAGGTACGCATTTGACC ATCGTTCGCAAGAATCACAA	<i>wrbA</i>	derecho	592
H D	CCGACCTTTGTACGGATGTAA CGAATCGCTACGGAATAGAGA	<i>wrbA</i>	izquierdo	506

Las concentraciones de los reactivos utilizados para la realización de la PCR fueron las mismas que las descritas en el Capítulo 1 y las condiciones de la PCR las siguientes:

A) Desnaturalización: 4 min a 94 °C

B) Repetición durante 30 ciclos:

Desnaturalización: 30 s a 94 °C

Unión de los cebadores "annealing": 30 s a 58 °C

Elongación: 30 s a 72 °C

C) Elongación final: 7 min a 72 °C

D) Conservación de la muestra: tiempo indefinido a 4 °C

### **3.2.7. Observación de la morfología de los bacteriófagos purificados al microscopio electrónico de transmisión (MET)**

Aquellas cepas STEC en las que se había detectado presencia de bacteriófagos portadores del gen *stx*<sub>2</sub> mediante las técnicas anteriormente descritas, fueran cepas aisladas naturalmente o transductantes, fueron escogidas para la realización de estudios de morfología de los bacteriófagos presentes mediante el MET. Las otras cepas no fueron incluidas en el estudio ya que, si bien no se pudo descartar la presencia de bacteriófagos *stx*<sub>2</sub>, los niveles de bacteriófagos observados tras la inducción no eran suficientes como para poder ser visualizados mediante microscopía electrónica, ya que se necesitan un mínimo de 10<sup>8</sup> UFP/ml.

#### **3.2.7.1. Preparación de las muestras**

Se prepararon cultivos de 10 ml de cada una de las cepas STEC que resultaron positivas para la presencia de bacteriófagos portadores del gen *stx*<sub>2</sub>. Estos cultivos se prepararon a partir de cultivos recientes, inoculando algunas colonias en LB modificado con 5 mM de CaCl<sub>2</sub>, para realizar la inducción de los bacteriófagos de acuerdo con el método utilizado anteriormente y descrito en el apartado de Materiales y Métodos generales (Anexo III).

Seguidamente, una vez purificados los bacteriófagos, se concentraron utilizando filtros concentradores Amicon<sup>®</sup> Ultra-4 (Millipore, Mosheim, Francia). Este paso era necesario para poder ser visualizados con el MET, debido a los bajos títulos que normalmente se obtenían tras la inducción del ciclo lítico. Para ello, se realizaron centrifugaciones sucesivas de 10 min a 4000 x *g* hasta que los 10 ml iniciales fueron reducidos a un volumen final de, aproximadamente, 200 µl, tal como se describe en el apartado de Materiales y Métodos generales (Anexo III).

Antes de proceder a la visualización de los bacteriófagos, los bacteriófagos fueron contrastados mediante una tinción negativa (30) descrita en el apartado de Materiales y Métodos generales (Anexo III).

#### **3.2.7.2. Observación mediante el microscopio electrónico de transmisión (MET)**

Las muestras se examinaron con el MET Hitachi 600 a un voltaje de 80 KV. Para la observación se utilizaron entre 60000 y 80000 aumentos y se realizaron fotografías digitales, que fueron procesadas directamente con el ordenador.

### **3.3- Resultados\***

#### **3.3.1. Inducción del ciclo lítico de los bacteriófagos presentes en las cepas STEC aisladas y caracterización de los bacteriófagos inducidos**

##### **3.3.1.1. Estimación del nivel de inducción**

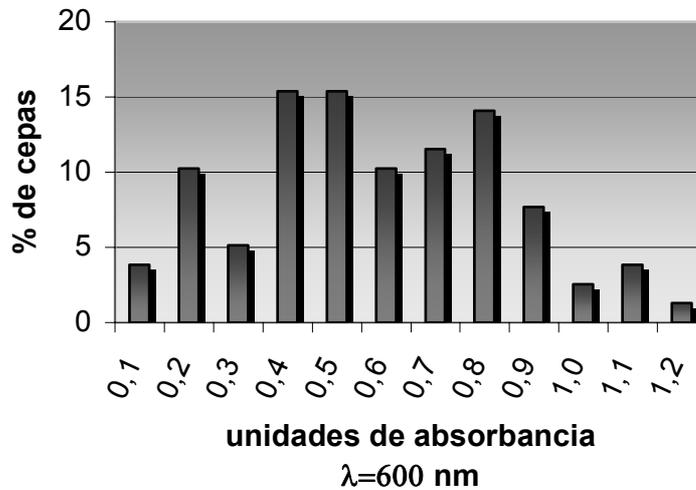
Se realizó una primera estimación del nivel de inducción de los bacteriófagos presentes en las cepas STEC a partir de las lecturas de absorbancia obtenidas a las 24 h de los cultivos que habían sido tratados con mitomicina C.

Tal como muestra la **Figura 3.1**, se observó una gran variabilidad en cuanto al nivel de inducción de bacteriófagos en las diferentes cepas. Así pues, se distinguieron cepas que presentaron un nivel de inducción muy elevado, con valores de absorbancia de 0,1 unidades, correspondientes a cultivos en los que prácticamente se habían lisado todas las bacterias y, en el otro extremo, cepas en las que no se observó prácticamente ningún efecto del tratamiento de inducción, mostrando valores de absorbancia de hasta 1,2, correspondiente a la fase estacionaria. No obstante, aproximadamente el 60% de las cepas mostraron buenos niveles de inducción, mostrando valores entre 0,1 y 0,6 unidades de absorbancia.

Los cultivos en los que no se aplicó el tratamiento de inducción mostraron unos valores de absorbancia a las 24 h de  $1,6 \pm 0,2$ .

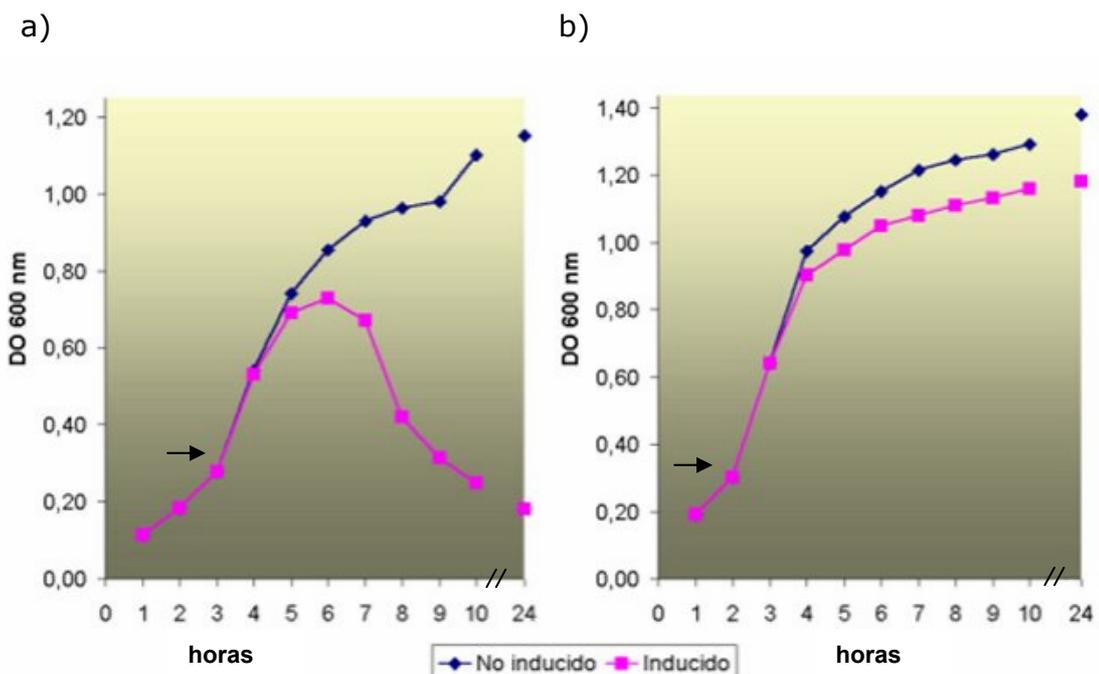
\* Los Resultados de este capítulo se resumen en el **Anexo I**.

**Fig. 3.1-** Inducción del ciclo lítico de los bacteriófagos presentes en las cepas STEC aisladas



En la siguiente figura (3.2) se muestra, a modo de ejemplo, la evolución de dos cultivos de dos cepas (una muy inducible y otra poco inducible) a las que se les ha realizado el tratamiento de inducción con mitomicina C, en comparación con cultivos de las mismas cepas que no fueron sometidas a dicho tratamiento.

**Fig 3.2 -** Efecto del tratamiento de inducción con mitomicina C en el crecimiento de dos cepas, estimado indirectamente a partir de los valores de absorbancia obtenidos: a) cepa con elevada inducción; b) cepa con baja inducción.



La flecha indica el momento de la adición de mitomicina al cultivo

Mientras que en una de las cepas (a) se observa un descenso en los valores de absorbancia a partir de, aproximadamente, 0,8 unidades de absorbancia, en la otra cepa (b) el efecto de la adición de mitomicina tiene un efecto prácticamente nulo en los valores de absorbancia, aunque la curva muestra un ligero descenso en comparación con los valores de absorbancia de la misma cepa en el caso de no haber recibido el tratamiento con mitomicina.

La gráfica a) corresponde a una cepa que presenta un buen nivel de inducción, de la cual fue posible extraer grandes cantidades de ADN, mientras que en la b) prácticamente no se detectó inducción de los bacteriófagos, y no se consiguió visualizar banda correspondiente a la extracción de ADN fágico.

### **3.3.1.2. Extracción de ADN de los bacteriófagos inducidos**

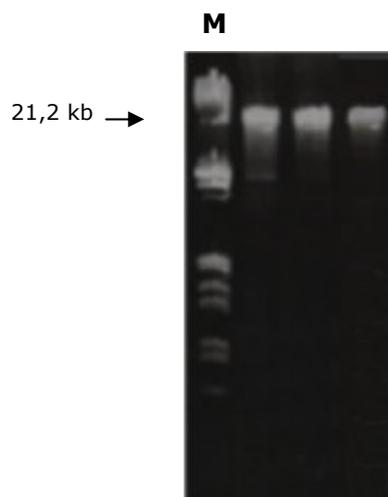
El ADN total de los bacteriófagos inducidos fue visualizado mediante electroforesis en un gel con un 0,8% de agarosa y tinción con bromuro de etidio a título orientativo para seguir o no el proceso.

En la mayoría de casos se observó una sola banda con peso molecular superior a los 21,2 Kb (correspondiente a la banda superior del marcador de peso molecular utilizado). No obstante, en algunos casos se visualizaron dos bandas de diferente peso molecular, posiblemente correspondiente a diferentes bacteriófagos. Asimismo, se observaron diferencias en cuanto a la cantidad de ADN extraído, obteniéndose una correlación positiva entre el nivel de inducción, comentado en el apartado anterior, y la cantidad de ADN extraída.

Hay que señalar que, en algunos casos, la cantidad de ADN extraído no fue suficiente como para ser visualizado en los 5  $\mu$ l analizados en el gel de agarosa y, en otras ocasiones, se obtuvo tan poca cantidad que no fue posible realizar algunos de los análisis posteriores, como el estudio del patrón RFLP. Se intentó solventar este problema realizando cultivos de mayor volumen y concentrando el ADN en un volumen de H<sub>2</sub>O menor, pero en algunas ocasiones no fue suficiente.

En la siguiente **Figura 3.2** se muestran algunas de las extracciones de ADN de los bacteriófagos inducidos.

**Fig. 3.2** - Visualización del ADN extraído de los bacteriófagos inducidos en un gel de agarosa al 0.8% en TBE.



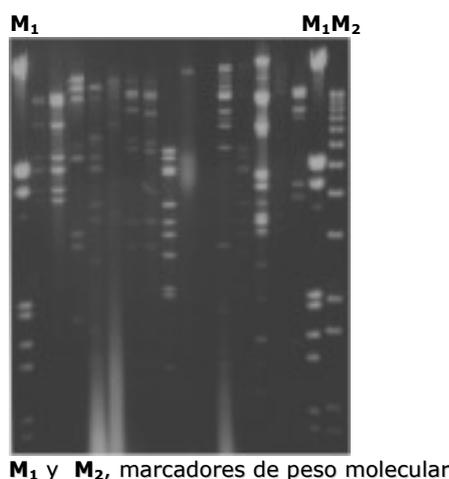
**M**, marcador de peso molecular ( $\lambda$ ); El resto de carriles muestra el ADN extraído de algunos de los bacteriófagos inducidos.

### **3.3.1.3. Análisis del patrón RFLP de los bacteriófagos inducidos**

Los bacteriófagos inducidos presentaron patrones RFLP muy diversos, sugiriendo la existencia de una elevada heterogeneidad genética entre los diferentes bacteriófagos que se encontraban insertados en las diferentes cepas. No obstante, algunos bacteriófagos inducidos procedentes de diferentes cepas presentaron un mismo patrón, como se discutirá más adelante, indicando la posibilidad de que las cepas tuvieran integrado el mismo tipo de bacteriófago. Seguramente los perfiles de muchos de estos bacteriófagos corresponderían a perfiles de bacteriófagos portadores del gen *stx<sub>2</sub>*, aunque esto no se puede afirmar si no son transducidos y analizados de nuevo. En la **Figura 3.3** se muestran algunos de los patrones RFLP obtenidos.

De algunas cepas, como se ha indicado anteriormente, no se obtuvo suficiente ADN fágico después de la inducción como para poder realizar el análisis del patrón RFLP y, en otras, el patrón de digestión obtenido resultó demasiado difuso como para poder distinguir con nitidez las diferentes bandas. Así pues, se consiguió realizar la extracción de ADN de la fracción fágica y visualizar correctamente el patrón RFLP en un total de 65 cepas de las 79 que fueron objeto de este estudio.

**Fig. 3.3.** Diversidad de patrones RFLP en los bacteriófagos inducidos de las cepas STEC inducidas



El tamaño del genoma de los bacteriófagos inducidos fue estimado a partir de la suma de los fragmentos de restricción obtenidos, observándose también diferencias en este aspecto entre los diferentes bacteriófagos. La suma de los fragmentos obtenidos después de la digestión osciló desde alrededor de 50 Kb hasta 125 Kb. De acuerdo con la información disponible del peso molecular de los bacteriófagos que transducen el gen *stx*<sub>2</sub> (generalmente fagos lambdoides) en el caso de haber bandas que sumen hasta 125 kb cabe pensar en que se ha inducido más de un bacteriófago.

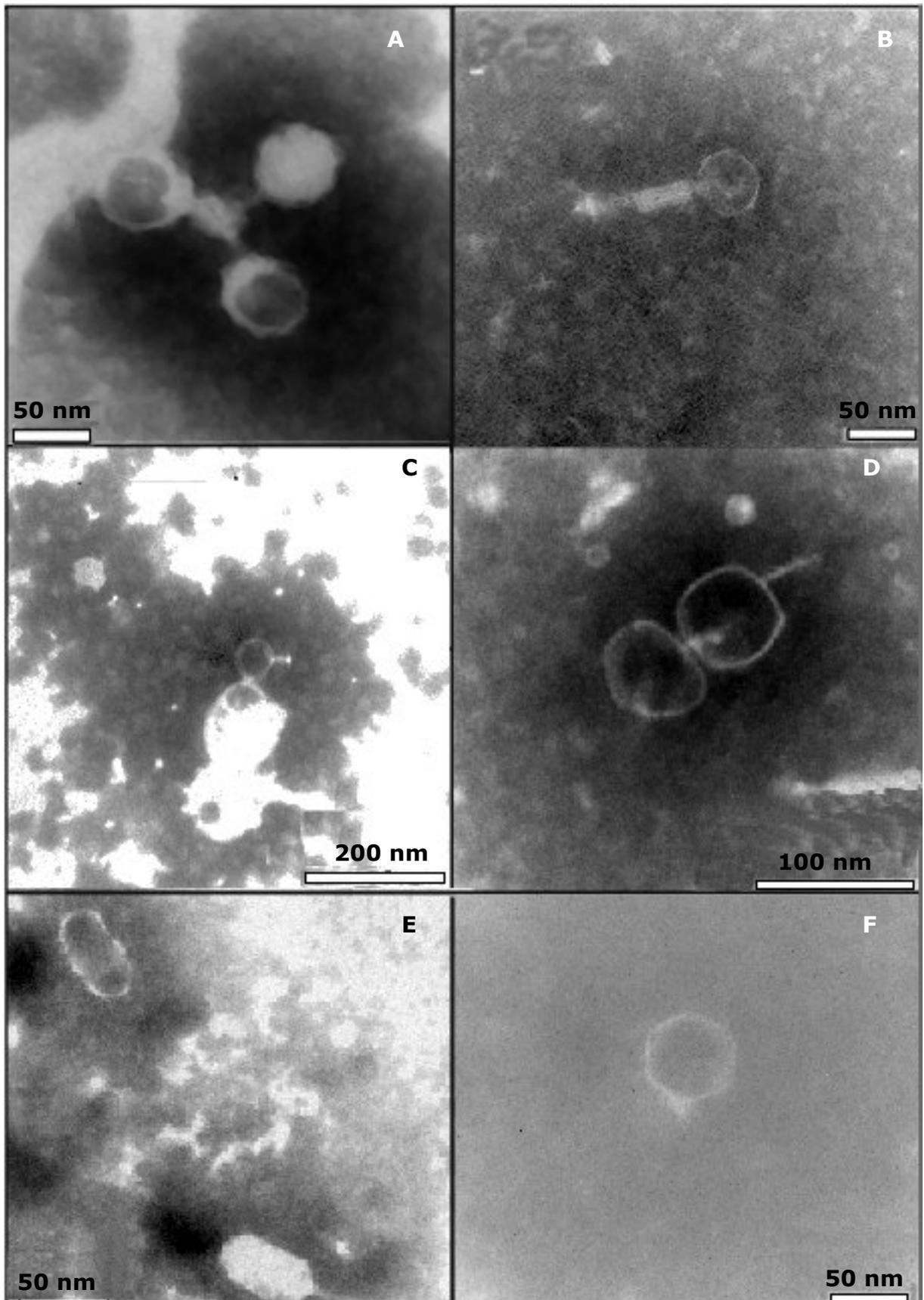
#### **3.3.1.4. Observación de la morfología de los bacteriófagos más abundantes mediante el microscopio electrónico de transmisión (MET)**

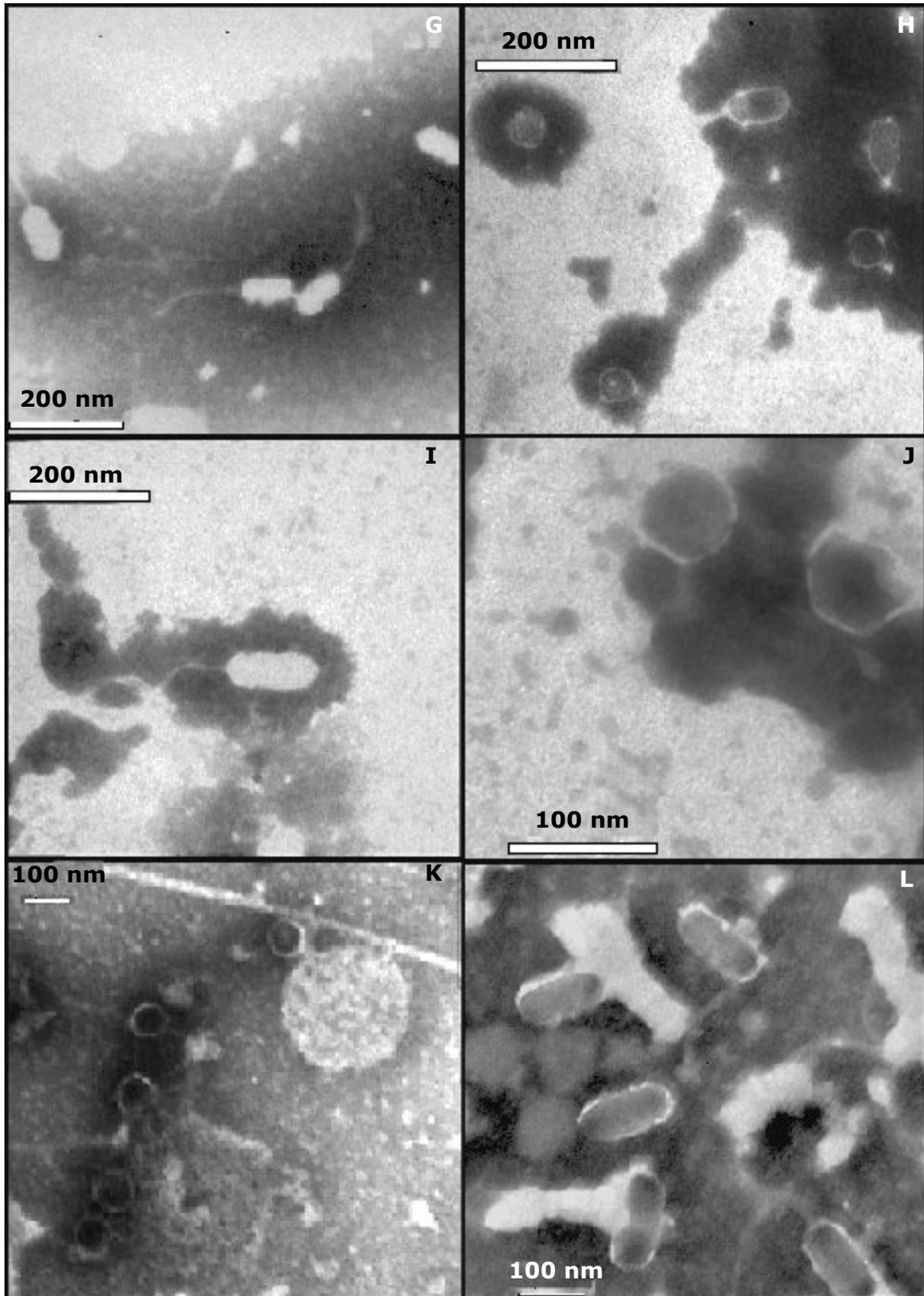
Para el estudio de morfología de los bacteriófagos se escogieron los bacteriófagos inducidos de aquellas cepas que habían mostrado valores elevados de inducción.

Se observaron bacteriófagos en la mayoría de las preparaciones analizadas. La morfología más frecuente fue la correspondiente a los prototipos de bacteriófagos portadores del gen *stx*<sub>1</sub> y *stx*<sub>2</sub> que fueron inicialmente descritos, el 933W y el H19, con cápsides icosaédricas con

capsómeros hexagonales y cola corta, y cápsides alargadas y cola larga, respectivamente. No obstante, como ya ha sido descrito en otros estudios, no se encontró ninguna relación entre la morforlogía del bacteriófago y la presencia de un determinado gen *stx*.

En la **Figura 3.4** y **3.5** se muestran algunas de las morfologías de bacteriófagos observadas en las cepas aisladas. Además de la morfología típica del bacteriófago 933W y H19 anteriormente comentada, se observó un bacteriófago con cápside icosaédrica y cola larga contráctil (morfología poco habitual en fagos lisogénicos atemperados), como se muestra en la **Figura 3.4 B**, inducido de la cepa 48S. Asimismo, se detectó también otro bacteriófago similar al 933W pero con la cápside más alargada (**Figura 3.5, H**) en combinación con otro bacteriófago similar al 933W, indicando la presencia de al menos estos dos bacteriófagos en la cepa S106. En el **Anexo I** se resumen los diferentes bacteriófagos observados en las diferentes cepas analizadas.

**Fig. 3.4** - Morfologías de los bacteriófagos inducidos más abundantes

**Fig. 3.5** - Morfología de los bacteriófagos inducidos más abundantes

### **3.3.1.5. Análisis del espectro de huéspedes**

#### **3.3.1.5.1. Espectro de huéspedes de los fagos presentes en la cepa huésped determinado por las zonas de lisis observadas**

Con el fin de determinar la especificidad de los bacteriófagos inducidos se evaluó su capacidad de infectar diferentes cepas huésped.

En la **Tabla 3.1** se muestra la diversidad de zonas de lisis observadas en las diferentes cepas huésped analizadas. Con diferencia, las cepas huésped sensibles a un mayor número de bacteriófagos fueron las cepas de *Shigella sonnei* (866), *Escherichia coli* C600, *Shigella sonnei* (685) y *Shigella dysenteriae* (500), y *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , descritas en el apartado de Materiales y Métodos del presente capítulo, en las que se detectaron 57, 52, 50, 48 y 34 zonas de lisis, respectivamente. Hay que recordar que si bien las cepas de *E. coli* son cepas de laboratorio, las cepas de *Shigella* son de origen clínico.

#### **3.3.1.5.2. Espectro de huéspedes de los fagos portadores del gen *stx*<sub>2</sub>**

La comprobación de la presencia de bacteriófagos portadores del gen *stx*<sub>2</sub> en las zonas de lisis se realizó mediante la hibridación de estas zonas de lisis después de su transferencia a membranas de nylon. Así pues, atendiendo a los resultados obtenidos en la hibridación, muchas de las zonas de lisis detectadas fueron originadas por bacteriófagos atemperados que no eran portadores del gen *stx*<sub>2</sub>. Asimismo, hay que señalar que la ausencia de zona de lisis no fue suficiente como para descartar la ausencia de infección con fagos portadores del gen de la *Stx*<sub>2</sub> puesto que, en algunos casos en los que no se detectó signo aparente de lisis, fue detectado un resultado positivo en la hibridación.

Las cepas que mostraron mayor infectividad por bacteriófagos portadores del gen *stx*<sub>2</sub> fueron las cepas de *Shigella sonnei* (866), *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , *Shigella sonnei* (685) y *Escherichia coli* C600, en las que se detectó señal positiva en la hibridación de las zonas de lisis en 40, 36, 35 y 32 casos,

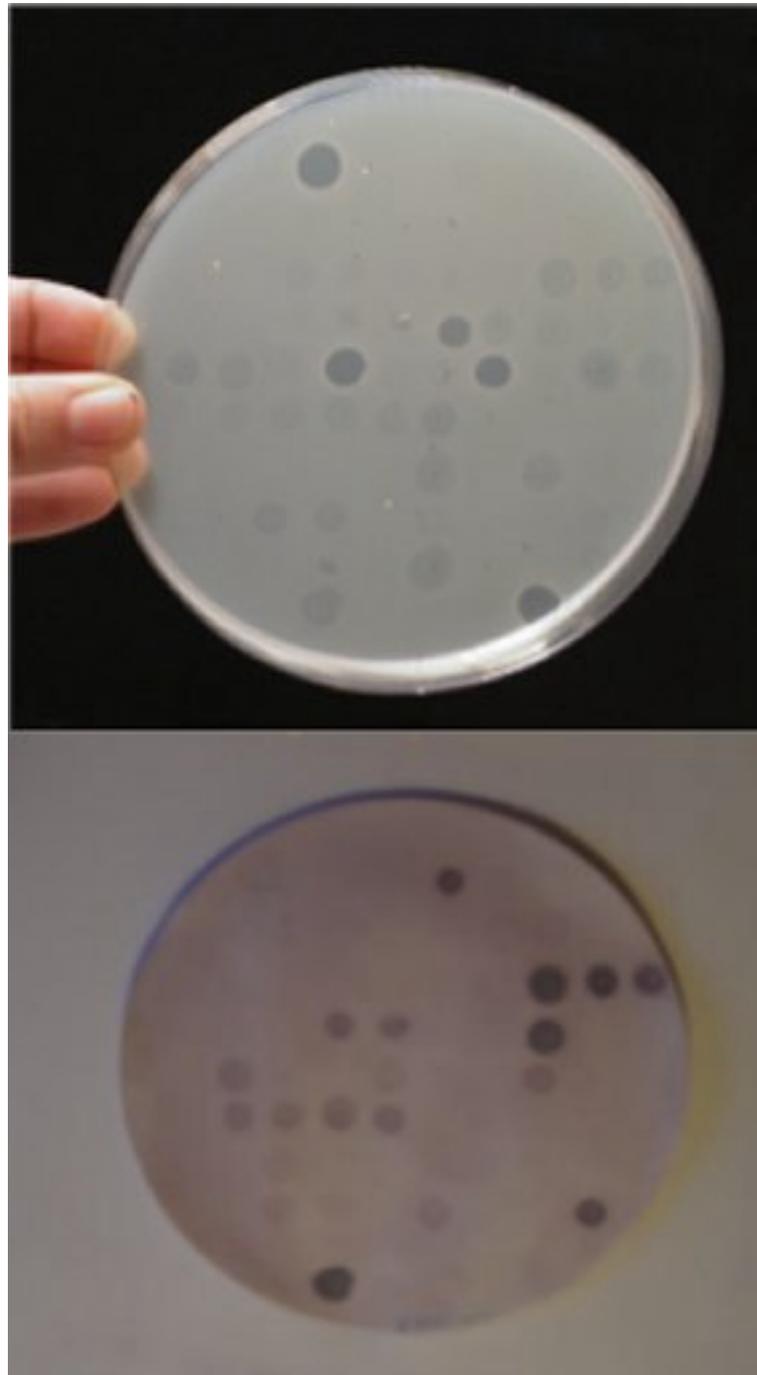
respectivamente, que como se ha señalado anteriormente, no necesariamente coinciden con las que originan zonas visibles de lisis.

Cabe señalar que un número apreciable de bacteriófagos *stx*<sub>2</sub> fue capaz de infectar *E. coli* O157:H7 (19). Además, 14 de los 15 bacteriófagos inducidos de las cepas O157 fueron capaces de infectar cepas de *E. coli* pertenecientes al mismo serotipo.

Asimismo, un número no despreciable de bacteriófagos *stx*<sub>2</sub> fue capaz de infectar *Enterobacter* y *Citrobacter*, por encima de otras cepas de *E. coli* procedentes de aislamientos clínicos.

En la **Figura 3.6** se muestra un ejemplo de las zonas de lisis y de hibridación observadas al utilizar *Shigella sonnei* (866) como cepa huésped.

**Fig. 3.6** - Zonas de lisis observadas y detección mediante hibridación del gen *stx*<sub>2</sub> en las zonas de lisis





Cepa	Origen	<i>E. coli</i> C600		<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$		<i>E. coli</i> O111		<i>E. coli</i> O26 (216)		<i>E. coli</i> O26 (224)		<i>E. coli</i> O157:H7 (43888)		<i>E. coli</i> O157 (11)		<i>E. coli</i> O157 (44)		<i>E. coli</i> O157 (151)		<i>S. sonnei</i> (866)		<i>S. sonnei</i> (635)		<i>S. dysenteriae</i> (500)		<i>S. boydii</i> (316)		<i>S. boydii</i> (351)		<i>S. flexneri</i> (805)		<i>S. flexneri</i> (668)		<i>Ent. aerogenes</i>		<i>Citrobacter freundii</i>						
		L	H	L	H	L	H	L	H	L	H	L	H	L	H	L	H	L	H	L	H	L	H	L	H	L	H	L	H	L	H	L	H	L	H	L	H					
S78	H	+	-	-	-	-	-	++	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
S79	H	+++	-	+++	+	-	-	++	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+++	-	++	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+		
S80	H	++	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
S82	B	++	-	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++	+	++	-	++	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
S85	B	++	-	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
S86	B	+	-	-	-	-	-	++	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	++	+	++	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
S90	B	++	+	-	-	-	-	++	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	++	+	++	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
S91	B	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	++	+	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
S93	B	++	+	+	+	-	-	++	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	++	+	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
S94	B	++	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+++	+	++	+	++	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+		
S96	B	-	-	++	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
S98	B	++	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
S99	B	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
S102	B	-	-	+	-	-	-	++	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	++	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
S106	B	++	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	++	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
S107	B	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	++	+	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
S108	B	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	++	+	++	+	++	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
S109	B	+++	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+++	-	+++	-	+++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
S110	B	+	+	-	+	++	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	++	+	++	+	++	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	
S113	B	+	+	++	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	++	+	++	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
S114	B	+++	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+++	-	+++	-	+++	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S115	B	+	-	++	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	++	+	++	+	++	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
S116	B	+++	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+++	-	++	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
S119	H	+++	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	++	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
S120	H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
S121	H	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
S124	B	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	++	+	++	+	++	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
S125	B	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	++	+	++	+	++	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
S126	B	-	-	+++	-	+++	-	+++	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+++	-	+++	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Cepa	Origen	<i>E. coli</i> C600		<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$		<i>E. coli</i> O111		<i>E. coli</i> O26 (216)		<i>E. coli</i> O26 (224)		<i>E. coli</i> O157:H7 (43888)		<i>E. coli</i> O157 (11)		<i>E. coli</i> O157 (44)		<i>E. coli</i> O157 (151)		<i>S. sonnei</i> (866)		<i>S. sonnei</i> (635)		<i>S. dysenteriae</i> (500)		<i>S. boydii</i> (316)		<i>S. boydii</i> (351)		<i>S. flexneri</i> (805)		<i>S. flexneri</i> (668)		<i>Ent. aerogenes</i>		<i>Citrobacter freundii</i>					
		L	H	L	H	L	H	L	H	L	H	L	H	L	H	L	H	L	H	L	H	L	H	L	H	L	H	L	H	L	H	L	H	L	H	L	H	L	H		
<b>S133</b>	B	+++	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	++	-	++	-	+++	+	-	+	-	-	++	-	++	-	-	-	-	-	-	-		
<b>S134</b>	B	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	++	+	++	+	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
S138	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
S140	M	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
S141	M	+	-	-	-	-	-	++	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
S146	M	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	++	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<b>S147</b>	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<b>S148</b>	P	+++	+	+++	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	++	+	++	+	+++	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
S149	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<b>S150</b>	P	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<b>O3</b>	B	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	++	+	++	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+		
<b>O9</b>	B	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	++	+	++	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+		
<b>O16</b>	B	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	
<b>O17</b>	B	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
<b>O22</b>	B	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
<b>O24</b>	B	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
<b>O29</b>	B	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
<b>O58</b>	B	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
<b>O63</b>	B	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
<b>O67</b>	B	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	++	+	++	+	++	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
<b>O69</b>	B	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	++	+	++	+	++	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
<b>O72</b>	B	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	++	+	++	+	++	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
O73	B	+++	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-	+++	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>O84</b>	B	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	++	+	++	+	-	+	-	+	-	-	++	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	
<i>E. coli</i> C600 (933)	Control	++	+	++	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	++	+	++	+	++	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	

**L**, Aspecto de la zona de lisis: - Ausencia de zona de lisis; +, Zona de lisis apenas perceptible; ++, Zona de lisis translúcida; +++, Zona de lisis muy translúcida.  
**H**, Detección del gen *stx*<sub>2</sub> mediante hibridación de las zonas de lisis: +, presencia del gen *stx*<sub>2</sub>; -, ausencia del gen *stx*<sub>2</sub>. En negrita se muestran los positivos para el gen *stx*<sub>2</sub>.  
**O**, Origen de la cepa: **H**, agua residual urbana; **B**, agua residual de matadero bovino; **P**, agua residual de matadero porcino; **M**, agua residual de origen mixto.

Los bacteriófagos *stx*<sub>2</sub> que mostraron un espectro de huéspedes más amplio para las cepas huéspedes analizadas fueron los purificados a partir de la cepa S8, clasificada como *E. coli* O146:H<sup>-</sup> y aislada de agua residual urbana, y las cepas S124 y S125, clasificadas ambas como *E. coli* O1:H20 y aisladas de agua residual de matadero bovino. Los bacteriófagos inducidos de estas cepas fueron capaces de infectar todas las cepas huésped estudiadas.

Por otro lado, los bacteriófagos *stx*<sub>2</sub> que mostraron un espectro reducido de huéspedes fueron capaces de infectar únicamente a cepas de *Shigella*. Así pues, los bacteriófagos *stx*<sub>2</sub> inducidos de la cepa S69, sólo infectaron a *S. sonnei*, los de la cepa S78, únicamente infectaron a *S. dysenteriae*, los de la cepa S80, infectaron a *S. boydii* y, por último, los de las cepas S98 y S147, infectaron exclusivamente a *S. dysenteriae*.

El gen *stx*<sub>2</sub> fue detectado en el 63% (50 de 79) de los bacteriófagos inducidos mediante la detección del gen *stx*<sub>2</sub> en las zonas de lisis aunque, como se ha indicado anteriormente, no todos los bacteriófagos pudieron ser caracterizados genéticamente mediante RFLP.

La distribución de bacteriófagos *stx*<sub>2</sub> en las cepas aisladas fue variable en función del origen de éstas. Así pues, el 80% de las cepas aisladas de agua residual de matadero y heces de bovino (40 de 50) y el 50% de las cepas aisladas de agua de matadero porcino (3 de 6) eran lisogénicas para bacteriófagos portadores del gen *stx*<sub>2</sub> capaces de infectar a las cepas analizadas. Un porcentaje menor de cepas, el 33% de las cepas de origen mixto (3 de 9), únicamente y el 28% de las cepas aisladas de agua residual urbana (4 de 14) fueron positivas para la presencia de estos bacteriófagos. Así pues, el agua residual animal presentó mayor porcentaje de cepas portadoras de bacteriófagos *stx*<sub>2</sub> inducibles *in vitro* mediante las técnicas utilizadas.

En cuanto a la producción de proteína Stx<sub>2</sub>, discutida en el Capítulo 2, se observó una correlación positiva entre presencia de bacteriófagos *stx*<sub>2</sub> inducibles y la producción de proteína. Así pues, todas las cepas en las que se detectó producción de proteína Stx<sub>2</sub>, con la excepción de 3 (todas ellas de serotipos diferentes) eran portadoras de estos bacteriófagos. Sin embargo,

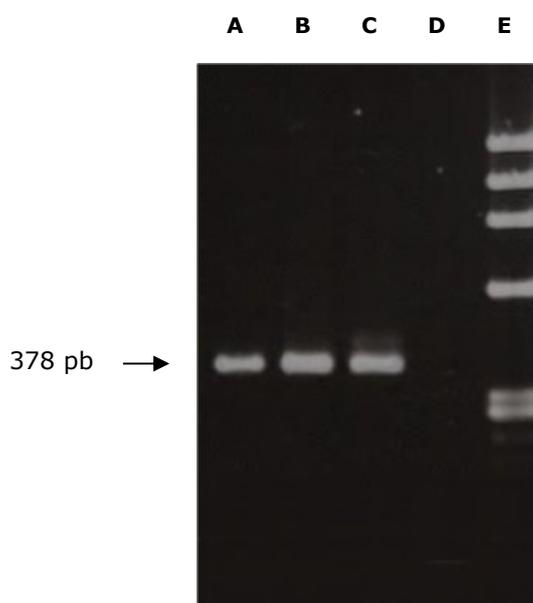
hay que señalar que en 11 cepas en las que se detectó presencia de bacteriófagos *stx*<sub>2</sub> (también de serotipos diferentes) no se detectó producción de proteína aunque, como ya se indicó en el Capítulo 2, el porcentaje de cepas en las que se detectó producción de proteína fue relativamente bajo en general (no siendo detectada en ninguna de las cepas con el gen *stx*<sub>2d</sub> ni *stx*<sub>2e</sub>).

### **3.3.1.6. Detección molecular del gen *stx*<sub>2</sub> mediante PCR**

#### **3.3.1.6.1 Detección del fragmento genérico del gen *stx*<sub>2</sub> de 378 pb**

La presencia del gen *stx*<sub>2</sub> en el ADN fágico fue detectada en el 89% de las muestras analizadas, detectándose incluso en aquellas en las que se habían observado bajos niveles de inducción.

**Fig. 3.8** - Detección del fragmento genérico de 378 pb

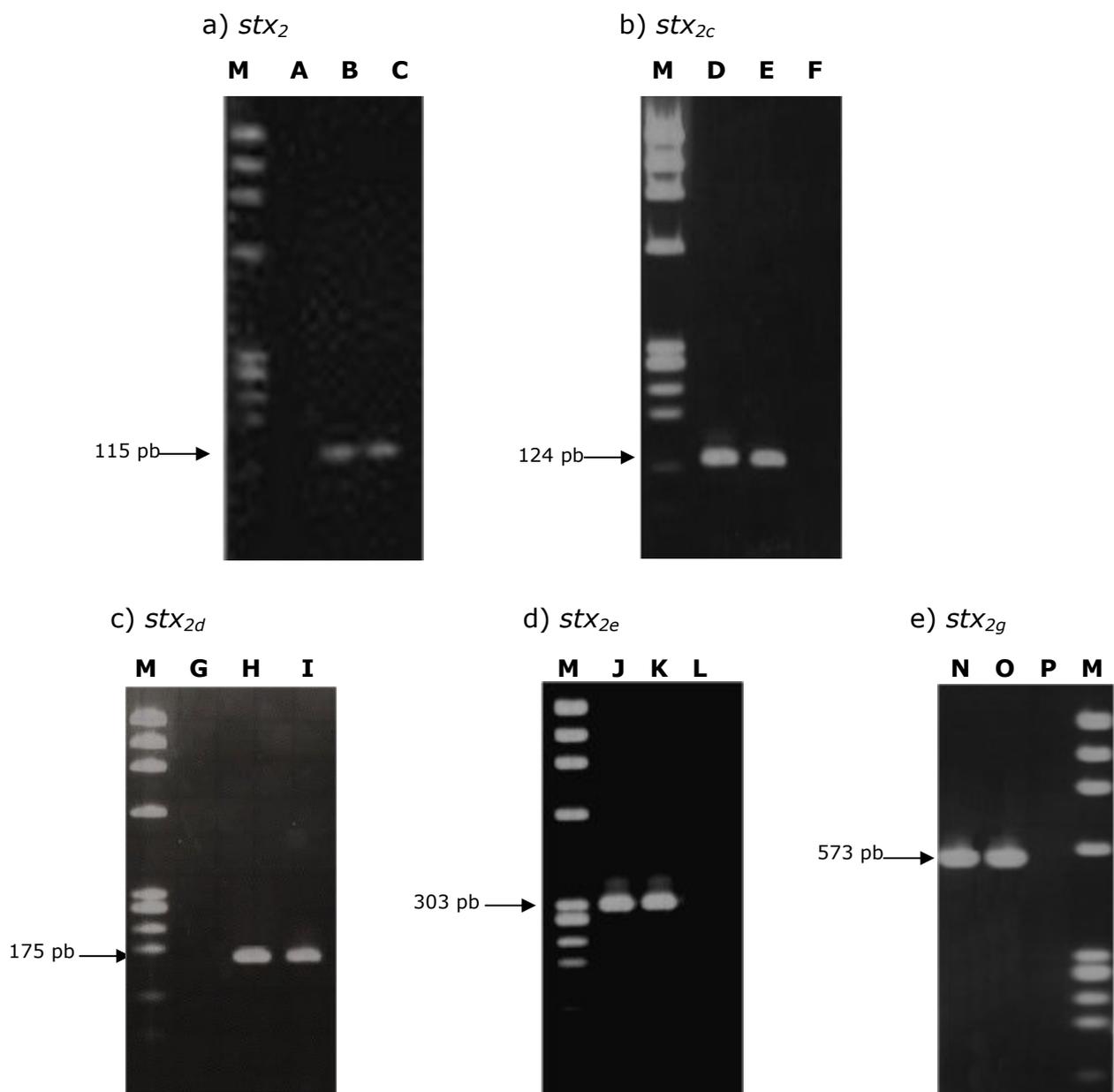


**A y B** algunas de las muestras analizadas que resultaron positivas; **C**, **D**, controles positivo y negativo respectivamente; **M**, marcador de peso molecular (PhiX174)

### 3.3.1.6.2. Detección de bacteriófagos portadores de las diferentes variantes del gen *stx*<sub>2</sub>

Se detectaron bacteriófagos portadores del gen *stx*<sub>2</sub> para las diferentes variantes del gen *stx*<sub>2</sub>, *stx*<sub>2c</sub>, *stx*<sub>2d</sub>, *stx*<sub>2e</sub> y *stx*<sub>2g</sub> a partir de los resultados obtenidos en la PCR (**Figura 3.9**). Además, tal como se muestra en la **Tabla 3.2** estos bacteriófagos fueron inducidos de una gran variedad de serotipos de *E. coli* diferentes.

**Fig. 3.9** - Detección de las diferentes variantes de la familia del gen *stx*<sub>2</sub>



**A, B, D, E, H, I, J, K, N, O**, algunas muestras que resultaron positivas para cada una de las variantes indicadas; **A, F, G, L, P**, muestras que resultaron negativas; **M**, marcador de peso molecular (PhiX174)

**Tabla 3.2** - Serotipos en los que fue detectada la presencia de bacteriófagos *stx*<sub>2</sub>

Serotipo	Variante <i>stx</i> <sub>2</sub>	Nº de cepas
O1:H20	<i>stx</i> <sub>2e</sub>	2
O2:H2	<i>stx</i> <sub>2g</sub>	1
O2:H21	<i>stx</i> <sub>2e</sub>	1
O2:H25	<i>stx</i> <sub>2g</sub>	5
O8:H <sup>-</sup>	<i>stx</i> <sub>2e</sub>	1
O8:H9	<i>stx</i> <sub>2e</sub>	3
O22:H8	<i>stx</i> <sub>2c</sub>	1
O26:H <sup>-</sup>	<i>stx</i> <sub>2e</sub>	2
O76:H2	<i>stx</i> <sub>2c</sub>	1
O90:H <sup>-</sup>	<i>stx</i> <sub>2d</sub>	4
O91:H21	<i>stx</i> <sub>2</sub> / <i>stx</i> <sub>2c</sub>	1
O98:HNT	<i>stx</i> <sub>2c</sub>	1
O100:H <sup>-</sup>	<i>stx</i> <sub>2e</sub>	1
O113:H21	<i>stx</i> <sub>2</sub>	1
O127:H <sup>-</sup>	<i>stx</i> <sub>2</sub> / <i>stx</i> <sub>2d</sub>	1
O136:H1	<i>stx</i> <sub>2g</sub>	1
O146:H <sup>-</sup>	<i>stx</i> <sub>2</sub>	1
O157:H <sup>-</sup> /H7	<i>stx</i> <sub>2c</sub>	15
O159:H <sup>-</sup>	<i>stx</i> <sub>2e</sub>	1
O162:H7	<i>stx</i> <sub>2c</sub>	1
O166:H21	<i>stx</i> <sub>2d</sub>	1
O171:H2	<i>stx</i> <sub>2c</sub>	14
O181:H20	<i>stx</i> <sub>2c</sub>	2
O181:H49	<i>stx</i> <sub>2</sub>	1
ONT:H <sup>-</sup>	<i>stx</i> <sub>2e</sub>	3
ONT:H <sup>-</sup>	<i>stx</i> <sub>2c</sub>	1
ONT:H9	<i>stx</i> <sub>2e</sub>	1
ONT:H21	<i>stx</i> <sub>2e</sub>	1
ONT:HNT	<i>stx</i> <sub>2c</sub>	1

No obstante, únicamente en dos de las cepas STEC en las que originalmente se habían detectado dos variantes del gen *stx*<sub>2</sub> diferentes, se detectaron las dos variantes en el ADN extraído de los bacteriófagos inducidos.

La mayoría de bacteriófagos *stx*<sub>2</sub> capaces de infectar las cepas de *E. coli* O111, O26 y O157 eran portadoras del gen *stx*<sub>2</sub> y *stx*<sub>2c</sub>, si bien 2 bacteriófagos portadores del gen *stx*<sub>2e</sub> fueron capaces de infectar *E. coli* O26 y *E. coli* O157.

Asimismo, los que fueron capaces de infectar *Enterobacter* y *Citrobacter* también eran portadores en su mayoría de los genes *stx*<sub>2</sub> y *stx*<sub>2c</sub> (uno de ellos era portador del gen *stx*<sub>2e</sub>).

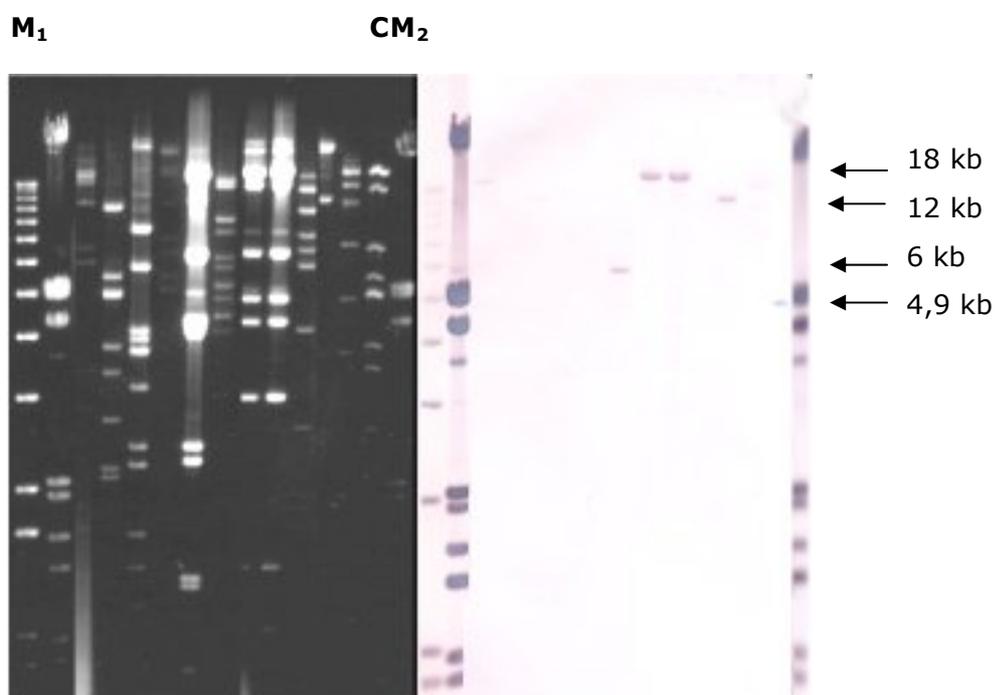
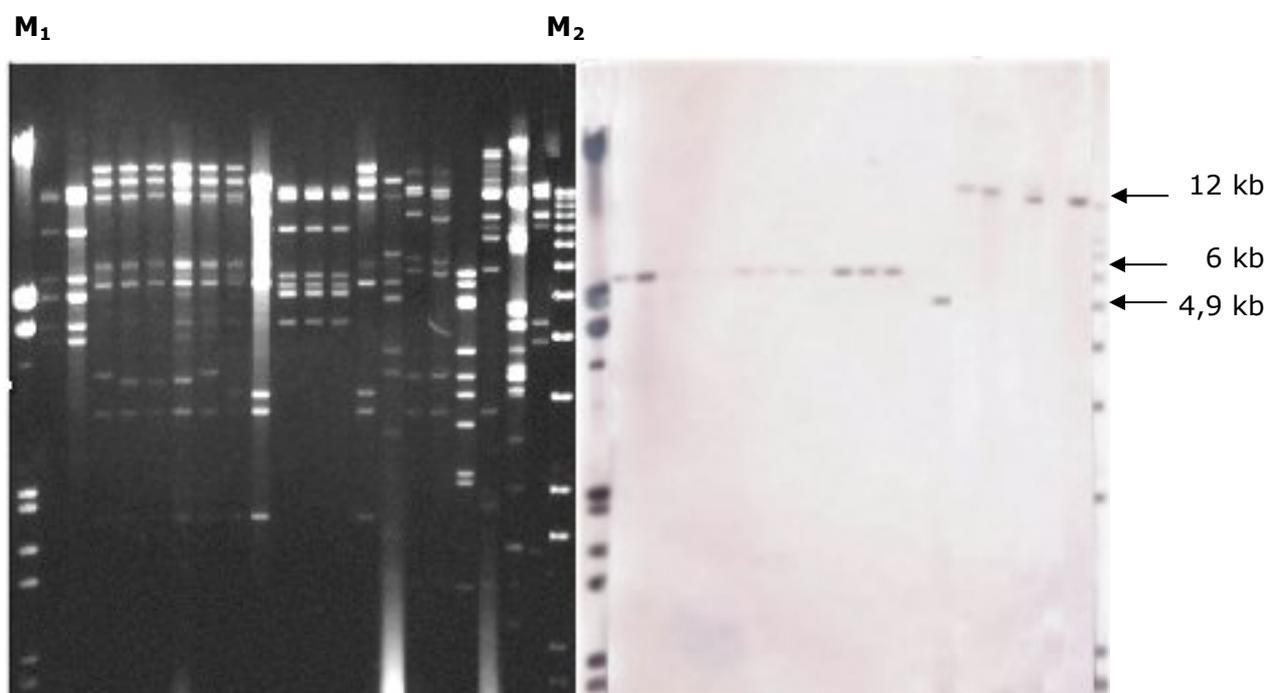
### **3.3.1.6.3. Estudio de la diversidad genética de los bacteriófagos** **stx<sub>2</sub>**

#### **3.3.1.6.3.1. Localización del gen *stx*<sub>2</sub>**

Debido al hecho de que cualquier bacteriófago que estuviera presente en las cepas analizadas podría haber mostrado un patrón RFLP similar a alguno de los observados (sin que necesariamente fuera portador del gen *stx*<sub>2</sub>), se analizó la presencia del gen *stx*<sub>2</sub> en el ADN de los bacteriófagos inducidos mediante la transferencia de los productos de la digestión del ADN a membranas de nylon e hibridación con la sonda de 378 pb descrita anteriormente.

El gen *stx*<sub>2</sub> fue detectado únicamente en el ADN de 34 de las 65 fracciones fágicas que fueron digeridas con el enzima *EcoRI*. Sin embargo, a pesar de la elevada diversidad de patrones RFLP observada (incluso entre aquellos fagos que incluyen el gen *stx*<sub>2</sub>), el fragmento de restricción *EcoRI* que resultó positivo en la hibridación presentó menor variabilidad en cuanto a peso molecular. Aquellos bacteriófagos inducidos en los que se había apreciado un mismo patrón de digestión presentaron, como era predecible, la misma banda positiva para el gen *stx*<sub>2</sub>. No obstante, algunos bacteriófagos que habían mostrado un patrón RFLP diferente también presentaron un fragmento de restricción positivo para el gen *stx*<sub>2</sub> del mismo tamaño. La **Figura 3.10** muestra las diferentes bandas observadas tras la hibridación con la sonda de 378 pb. El tamaño de los fragmentos donde se localizó el gen *stx*<sub>2</sub> osciló entre los 4,9 Kb y los 18 Kb, estimado a partir de los marcadores de peso molecular de ADN utilizados. Las diferentes bandas observadas antes y tras la hibridación se indican en la **Tabla 3.3**.

**Fig 3.10** - Patrones de restricción del ADN de los bacteriófagos inducidos y localización del gen *stx*<sub>2</sub> mediante transferencia "Southern" e hibridación con la sonda de 378 pb.



**C**, ADN del bacteriófago 933W utilizado como control positivo; **M<sub>1</sub>** y **M<sub>2</sub>**, marcadores de peso molecular

**Tabla 3.3-** Detección del fragmento *EcoRI* correspondiente al gen *stx*<sub>2</sub>.

Serotipos	Fragmento <i>EcoRI</i>
<b>O146:H-</b>	4,9 kb
<b>O91:H21</b>	6/4,9 kb
<b>O113:H21</b> <b>O157:H7</b>	6 kb
<b>O100:H<sup>-</sup></b>	11 kb
<b>O2:H25</b> <b>O26:H<sup>-</sup></b> <b>O90:H<sup>-</sup></b> <b>O171:H2</b> <b>O181:H20</b>	12 kb
<b>O98:HNT</b> <b>O171:H2</b>	15 kb
<b>O1:H20</b>	18 kb

Se muestra la medida aproximada del fragmento *EcoRI* que resultó positiva en la hibridación

Todos los bacteriófagos en los que se detectó la presencia del fragmento *EcoRI* positivo para el gen *stx*<sub>2</sub>, exceptuando el bacteriófago inducido de la cepa 106, fueron capaces de infectar alguna de las cepas huésped utilizadas. Así pues, el bacteriófago inducido de la cepa S106 no fue capaz de infectar ninguna de las cepas huésped analizadas.

### **3.3.1.7. Análisis de los sitios de integración de los bacteriófagos *stx*<sub>2</sub>**

De las 79 cepas analizadas que eran portadoras del gen *stx*<sub>2</sub> (15 *E. coli* O157:H7 y 64 *E. coli* no-O157:H7), únicamente una cepa presentó amplificación positiva utilizando los cebadores C-G y H-D que amplifican los extremos de unión entre el locus *wrbA* y el bacteriófago, sugiriendo que el locus *wrbA* se encontraba ocupado, presuntamente, por el bacteriófago portador de la toxina. Esta cepa fue aislada de agua residual urbana y fue clasificada como *E. coli* O146:H<sup>-</sup>, según los resultados obtenidos en el Capítulo 2. Así mismo, hay que destacar que el patrón RFLP del ADN del

bacteriófago obtenido fue muy similar al patrón RFLP del ADN del bacteriófago 933W utilizado como control positivo en los experimentos anteriores.

Contrariamente a lo esperado (por no haber sido descrito con anterioridad), algunas de las cepas únicamente presentaron amplificación sólo para uno de los extremos de los locus de inserción analizados. Así pues, un total de 10 cepas mostraron amplificación positiva para uno de los extremos del locus *yehV*, concretamente el originado por amplificación mediante los cebadores B y F. Estas cepas fueron aisladas de agua residual urbana y de matadero bovino y fueron clasificadas como *E. coli* O127:H<sup>-</sup>, O90:H<sup>-</sup>, O171:H2 (3 cepas), O113:H21, O157:H7 (15 cepas), O91:H21 y O22:H8 (2 cepas).

Respecto al locus *wrbA*, un total de 5 cepas presentaron amplificación positiva para el extremo C-G. Estas cepas pertenecían a 4 serotipos diferentes, *E. coli* O146:H21, O127:H<sup>-</sup>, O162:H7 y O90:H<sup>-</sup> (2 cepas).

Hay que señalar que 2 cepas (*E. coli* O127:H<sup>-</sup> y O90:H<sup>-</sup>), ambas procedentes de agua residual urbana, amplificaron simultáneamente para los extremos B-F y C-G, de los loci *yehV* y *wrbA*, respectivamente. Según los resultados del Capítulo 2, la cepa O127:H<sup>-</sup> eran portadora de dos variantes del gen *stx<sub>2</sub>*, *stx<sub>2</sub>* y *stx<sub>2d</sub>*, mientras que en la cepa O90:H<sup>-</sup> se detectaron dos copias del gen *stx<sub>2d</sub>*. Sin embargo, el resto de cepas analizadas que fueron identificadas como portadoras de más de una copia o de diferentes variantes del gen *stx<sub>2</sub>* no se detectó ninguna banda, por lo que no se pudo establecer ninguna relación entre la amplificación de alguno de los dos extremos de unión y la presencia de determinadas combinaciones del gen *stx<sub>2</sub>* en las diferentes cepas. No se puede establecer ninguna relación entre los bacteriófagos y los loci de inserción descritos hasta el momento.

### 3.3.2. Obtención de transductantes *in vitro*

Se realizaron experimentos con el fin de transducir los bacteriófagos que habían mostrado signos de infección para las cepas huésped analizadas. Como cepa huésped se utilizaron la cepa de *S. sonnei* (866) y *E. coli* DH5 $\alpha$  ya que, según los resultados del apartado anterior, éstas fueron las que fueron sensibles a un mayor número de bacteriófagos *stx*<sub>2</sub>.

De los 49 bacteriófagos inducidos ensayados, un total de 7 bacteriófagos portadores del gen *stx*<sub>2</sub> fueron capaces de ser transducidos. Las características de las cepas originales de las que los bacteriófagos habían sido inducidos y purificados se muestran en la **Tabla 3.5**.

Adicionalmente, se ensayó la transducción del bacteriófago inducido de la cepa S8, una de las cepas que habían mostrado un amplio espectro de cepas huésped, a *Enterobacter aerogenes* y *Citrobacter freundii*, obteniéndose resultados negativos en ambos casos.

#### 3.3.2.1. Caracterización de las cepas transductantes

En todas las cepas transductantes se detectó el gen *stx*<sub>2</sub> mediante PCR. No obstante, se obtuvieron diferencias en cuanto al nivel de inducción de los bacteriófagos y la producción de proteína respecto a los valores inicialmente obtenidos en las cepas de las que fueron purificados.

Así pues, en el caso del bacteriófago procedente de la cepa S8, que inicialmente presentaba valores de inducción elevados y estaba asociado con la producción de proteína *Stx*<sub>2</sub>, una vez transducido en la cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$  no fue posible obtener suficiente ADN fágico como para visualizar el patrón RFLP. Asimismo, no se detectó proteína *Stx*<sub>2</sub> en la cepa transducida, cuando en la cepa donadora sí que había sido detectada.

En el caso de otro bacteriófago, el obtenido de la cepa S150, ocurrió el caso inverso. Así pues, mientras que en la cepa original se detectó unos

niveles bajos de inducción y no se detectó producción de proteína Stx<sub>2</sub>, los niveles de inducción que presentó en la cepa transductante fueron superiores, detectándose, además, producción de proteína.

En los otros 5 bacteriófagos transducidos no se detectaron cambios apreciables con relación al nivel de inducción y producción de proteína con respecto a la cepa original.

El patrón RFLP de los bacteriófagos transducidos fue idéntico al patrón observado en las cepas originales de donde fueron purificados, en aquellas cepas en las que se consiguió visualizar.

Respecto a los sitios de integración utilizados por los 7 bacteriófagos transducidos, el bacteriófago purificado de la misma cepa que se ha descrito anteriormente, que amplificó para los dos extremos del gen *wrbA*, presentó idéntica amplificación en la nueva cepa receptora. En cambio, en otro de los bacteriófagos transducidos, que anteriormente no amplificaban para ninguno de los extremos de los loci de inserción estudiados, sí que lo hizo en la cepa receptora para uno de los extremos del gen *yehV*, el extremo BF. Los otros cinco bacteriófagos, que anteriormente no amplificaron para ninguno de los extremos tampoco lo hicieron en las nuevas cepas receptoras.

#### **3.3.2.2. Morfología de los bacteriófagos transducidos**

En el caso de las 7 cepas transductantes, se consiguió visualizar bacteriófagos en 5 de ellas, que se correspondían con la morfología observada inicialmente, en las cepas originales de donde fueron purificados.

En el resto, no fue posible la detección del bacteriófago por los bajos niveles de inducción observados.

**Tabla 3.5-** Características de los bacteriófagos inducidos de las cepas transductantes

Bacteriófago (a)	Cepa huésped transducida	<i>stx</i> <sub>2</sub>	Fragmento	Morfología
			<i>EcoRI</i>	
<b>S8</b>	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	<i>stx</i> <sub>2</sub>	ND	ND
<b>S48</b>	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	<i>stx</i> <sub>2e</sub>	ND	ND
<b>S62</b>	<i>Shigella sonnei</i> (866)	<i>stx</i> <sub>2c</sub>	12 kb	tipo H19 <sup>(b)</sup>
<b>S63</b>	<i>Shigella sonnei</i> (866)	<i>stx</i> <sub>2c</sub>	12 kb	tipo H19
<b>S67</b>	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	<i>stx</i> <sub>2c</sub>	12 kb	tipo H19
<b>S68</b>	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	<i>stx</i> <sub>2c</sub>	ND	tipo H19
<b>S150</b>	<i>Shigella sonnei</i> (866)	<i>stx</i> <sub>2e</sub>	ND	tipo 933W <sup>(c)</sup>

<sup>(a)</sup> bacteriófagos inducidos de las cepas indicadas; <sup>(b)</sup> bacteriófagos con morfología similar al fago H19, que se corresponde con las imágenes mostradas en la **Fig. 3.4** y **3.5 (E, G, I, y L)**; <sup>(c)</sup> bacteriófagos con morfología similar al fago 933W, que se corresponde con las imágenes mostradas en la **Fig. 3.4** y **3.5 (A, C, D, F, J y K)**; **ND**, no detectado



### 3.4 - Discusión

Los bacteriófagos atemperados constituyen un grupo de elementos genéticos móviles capaces de generar variabilidad en las diferentes especies bacterianas mediante su incorporación en el cromosoma bacteriano, lo que conlleva a su vez, en muchas ocasiones, la incorporación de diferentes genes que pueden conferir a la bacteria la capacidad de producir nuevos productos génicos. Así pues, los bacteriófagos constituyen un reservorio importante de genes que pueden ser movilizados en un determinado momento, contribuyendo a la emergencia de cepas bacterianas con nuevas características.

Este trabajo se ha centrado en el estudio de la diversidad de los bacteriófagos portadores del gen *stx*<sub>2</sub> inducidos de cepas STEC aisladas de aguas residuales y de su capacidad de transmitir horizontalmente el carácter toxigénico a diferentes cepas bacterianas.

Se observó presencia de bacteriófagos lisogénicos capaces de ser inducidos con mitomicina C en el 89% de las cepas analizadas (70 de 79). Las diferentes cepas bacterianas mostraron una elevada heterogeneidad, no sólo en el nivel de inducción de los bacteriófagos que se encontraban integrados en el cromosoma bacteriano, sino en cuanto a los diferentes patrones RFLP observados en los bacteriófagos inducidos, lo que sugiere una gran variabilidad de bacteriófagos en las cepas portadoras del gen *stx*<sub>2</sub> en los ambientes acuáticos estudiados.

Los bacteriófagos inducidos mostraron un espectro de huéspedes bastante amplio, infectando a varias de las cepas huésped ensayadas de los géneros *Escherichia* y *Shigella*.

En el análisis morfológico de los bacteriófagos inducidos más abundantes se detectaron mayoritariamente 2 morfologías, una formada por bacteriófagos con cápside icosaédrica y cola corta y otra de bacteriófagos con cápsides alargadas y colas más largas, morfologías descritas anteriormente para bacteriófagos *stx*<sub>2</sub> (133, 119), aunque de forma minoritaria se detectaron otras

morfologías. Sin embargo, no todos los bacteriófagos inducidos tenían que ser necesariamente portadores del gen *stx*<sub>2</sub>.

En cuanto a los bacteriófagos portadores del gen *stx*<sub>2</sub>, también se observó una elevada variabilidad. Esta variabilidad se observó tanto en el tamaño del fragmento *EcoRI* que resultó positivo en la hibridación del gen *stx*<sub>2</sub>, como en la variante del gen *stx*<sub>2</sub> del que eran portadores y en el espectro de huéspedes.

La elevada variabilidad genética observada en el ADN de los diferentes bacteriófagos *stx*<sub>2</sub> observada en este estudio, podría explicarse por la estructura genética de estos bacteriófagos. Así pues, según diversos estudios en los que se han secuenciado algunos de los bacteriófagos portadores del gen *stx*<sub>2</sub>, la estructura genética de estos bacteriófagos comparte cierta similitud con la del bacteriófago  $\lambda$ , de manera que posibilita recombinaciones entre los diferentes profagos, o genes de origen fágico que se hallan integrados en el cromosoma bacteriano, provocando diversas reorganizaciones en su genoma. De hecho en las dos cepas de *E. coli* O157 secuenciadas hasta el momento (65, 148), se ha observado la presencia de numerosos profagos similares al bacteriófago lambda en su estructura genética sugiriendo un papel importante de estos en la evolución de estas cepas patogénicas. Estas secuencias de origen fágico corresponden a la mitad de las secuencias específicas de este serotipo que no se han encontrado en la cepa de *E. coli* K12 (65).

No obstante, a pesar de estas recombinaciones se ha visto que se mantiene una estructura similar en las regiones flanqueantes de los genes *stx*, de manera que los bacteriófagos *stx* secuenciados mantienen una estructura similar al bacteriófago  $\lambda$  a pesar de las reorganizaciones producidas (198). La poca variabilidad observada respecto al tamaño del fragmento *EcoRI* del patrón RFLP del ADN fágico que resultó positivo en la hibridación específica para el gen *stx*<sub>2</sub> está en concordancia con estos estudios y sugieren, pues, que la evolución de los bacteriófagos *stx*<sub>2</sub> viene determinada por las recombinaciones entre genes de los diferentes bacteriófagos. Incluso, en algunas cepas en las que no se ha conseguido detectar presencia de bacteriófagos, se han observado secuencias de genes fágicos flanqueando los genes de las toxinas en serotipos STEC diferentes

(166), lo cual pone de manifiesto la importancia de los fagos en la emergencia de nuevos serotipos STEC.

Se observó una elevada homogeneidad en las cepas de *E. coli* O157:H7 en cuanto al fragmento RFLP que contenía el gen *stx*<sub>2</sub>, que fue de aproximadamente 6 kb de peso molecular. No obstante, en un estudio reciente sobre cepas de *E. coli* O157:H7 aisladas del brote que tuvo lugar en Barcelona en el 2001, se observó cierta variabilidad incluso en cepas aisladas del mismo brote (119), obteniéndose fragmentos de 4,9 y 5,9 kb de peso molecular tras la digestión e hibridación del ADN fágico con el enzima *EcoRI*, utilizando los mismos métodos que los utilizados en este estudio.

Se identificaron bacteriófagos portadores de las cinco variantes del gen *stx*<sub>2</sub> detectadas en el estudio, el gen *stx*<sub>2</sub>, *stx*<sub>2cr</sub>, *stx*<sub>2d</sub>, *stx*<sub>2e</sub> y *stx*<sub>2g</sub>. Si bien las variantes *stx*<sub>2</sub>, *stx*<sub>2cr</sub>, *stx*<sub>2d</sub> y *stx*<sub>2e</sub> han sido asociadas previamente a bacteriófagos *stx*<sub>2</sub>, no había sido descrito anteriormente ningún bacteriófago asociado al gen *stx*<sub>2g</sub>, que ha sido recientemente descrito en estas bacterias (100).

El espectro de huéspedes de los bacteriófagos *stx*<sub>2</sub>, obtenido tras la hibridación de las zonas de lisis observadas, fue más amplio que el obtenido teniendo únicamente en cuenta los resultados de aparición o no de zonas de lisis, ya que algunos de los bacteriófagos *stx*<sub>2</sub> infectaron a todas las cepas huésped ensayadas. Esto fue debido a que en algunos casos en los que no se detectó ninguna zona de lisis, sí que pudo detectarse infección por bacteriófagos portadores del gen *stx*<sub>2</sub>, tras la hibridación de las placas. No obstante, como ya se indicó anteriormente no se detectaron bacteriófagos *stx*<sub>2</sub> en todos los lisados fágicos. Así pues, se detectaron bacteriófagos portadores del gen *stx*<sub>2</sub> en el 53% de las cepas en las que se consiguió visualizar ADN fágico (en 34 de 64 patrones RFLP) se consiguió detectar el fragmento *EcoRI* correspondiente al gen *stx*<sub>2</sub>. La presencia de otros bacteriófagos en las cepas podría haber interferido con la inducción de los bacteriófagos *stx*<sub>2</sub> y/o en la hibridación de los fragmentos obtenidos en la digestión enzimática. No se descarta, tampoco, que los bacteriófagos *stx*<sub>2</sub> que no pudieron ser detectados en algunas de las cepas bacterianas hayan sufrido alguna alteración genética que impida su inducción o que no se haya utilizado su bacteria huésped.

El espectro de huéspedes de los bacteriófagos está determinado, principalmente, por la presencia de un receptor determinado que permita la adhesión del bacteriófago a la célula huésped, la entrada del ADN. La multiplicación o no del fago depende de otros factores entre los cuales destacan la posesión o no de un sistema de modificación-restricción. Para que un fago atemperado lisogenice una célula depende de que pueda encontrar una secuencia en el ADN cromosómico que permita la integración del bacteriófago, o de que pueda multiplicarse como un plásmido (como por ejemplo el fago P1 que infecta *E. coli*). Hay que destacar que, como en la mayoría de bacteriófagos *stx* analizados, la infección de cepas por estos bacteriófagos tiene como resultado el establecimiento de la lisogenia, desencadenándose en muy pocos casos la lisis (168, 72).

Se han realizado diferentes estudios en los que a pesar de detectarse producción de *Stx*<sub>2</sub> no se ha conseguido purificar ningún bacteriófago portador del gen *stx*<sub>2</sub>. Así pues, en un estudio realizado por Paton y Paton (141) identificaron una cepa de *Enterobacter cloacae* en la que a pesar de detectarse *Stx*<sub>2</sub> no fue posible identificar ningún bacteriófago. Por otro lado, en otro estudio en el que se analizaron las regiones flanqueantes de los genes *stx*<sub>2</sub> se observó una relación entre los genes *stx* y la presencia de genes de origen fágico, no sólo en cepas STEC sino también en cepas de *Shigella dysenteriae* tipo I de las que hasta la fecha no se ha conseguido aislar ningún bacteriófago asociado a la producción de *stx* (198). Sin embargo, en lugar del gen que codifica para la proteína reguladora Q, se encontró un elemento de inserción IS600 cerca del gen que codifica la subunidad A del gen *stx*, por lo que este bacteriófago se habría integrado en el cromosoma de *Shigella dysenteriae* y se habría convertido en un bacteriófago defectivo debido a recombinaciones e integración de elementos de inserción. Así pues, no se puede descartar que, a pesar de no haber sido posible detectar ningún bacteriófago portador del gen *stx*<sub>2</sub> en algunas de las cepas STEC, el gen esté flanqueado por genes de origen fágico.

A diferencia de lo que ocurre con el gen *stx* en *Shigella dysenteriae*, donde hasta la fecha no se ha conseguido aislar un bacteriófago asociado con el gen *stx*, los datos obtenidos en este estudio sugieren que las diferentes variantes del gen *stx*<sub>2</sub> están codificadas en bacteriófagos portadores de estos genes, capaces

de inducirse y infectar a nuevas cepas. Incluso el gen *stx<sub>2g</sub>*, recientemente descrito (100), que hasta la fecha ha sido asociado con ningún bacteriófago, parece estar codificado en uno de estos bacteriófagos.

El motivo de las diferencias entre el gen *stx* de *Shigella dysenteriae* y los genes *stxs* de *E. coli* en cuanto a la presencia de bacteriófagos portadores de estos genes se desconoce, aunque en una especie relacionada, *Shigella sonnei*, aislada de un paciente con diarrea, sí que se ha conseguido aislar un bacteriófago portador del gen *stx* (19) que podría haber sido transmitido horizontalmente por transducción y lisogenización, por lo que no se puede descartar la existencia de otras cepas de *Shigella* en las que el gen *stx* también esté codificado por un bacteriófago. La similitud entre los genes *stx* y *stx<sub>1</sub>* no permitió diferenciar si el bacteriófago de *S. sonnei* se trataba de un bacteriófago procedente transmitido a partir de una cepa de *E. coli* o de *Shigella*, aunque parecía muy adaptado a diversas cepas de *Shigella* (186). Asimismo, algunos de los bacteriófagos *stx<sub>2</sub>* detectados en este estudio parecen igualmente adaptados a cepas de *E. coli* de laboratorio y a cepas de *S. sonnei*, tal como muestran los resultados obtenidos al realizar el ensayo del espectro de huéspedes.

Hay que destacar que en una de las cepas bacterianas de las que se consiguió identificar el fragmento de ADN fágico conteniendo el gen *stx<sub>2</sub>* no se detectó infección en ninguna de las cepas huéspedes ensayadas. Esto pone de manifiesto la necesidad de desarrollar sistemas de detección de estos bacteriófagos que no se basen exclusivamente en analizar la capacidad infecciosa de éstos. Así pues, la combinación de las técnicas moleculares con estudios de infección aumentan la posibilidad de detectarlos ya que no siempre se dispone de la cepa huésped adecuada para la detección de un determinado bacteriófago.

El hecho de que se detectara un mayor número de bacteriófagos portadores del gen *stx<sub>2</sub>* en las cepas de origen animal, mayoritariamente de agua residual de matadero bovino, podría estar relacionado con el papel de estos animales como reservorio de estas cepas. La administración de factores de crecimiento, que en algunos casos son análogos a antibióticos podría favorecer la inducción del ciclo lítico de estos bacteriófagos, posibilitando la infección de nuevas cepas. Las cepas que fueron aisladas de agua residual urbana habrían

sufrido más alteraciones genéticas al estar más alejadas del reservorio original, lo que podría haber conducido a la inactivación del ciclo lítico del bacteriófago.

Asimismo, se observó una relación entre la producción de proteína  $Stx_2$  y la presencia de estos bacteriófagos con la excepción de 3 cepas en las que se detectó producción de proteína y ausencia de bacteriófagos  $stx_2$ . Sin embargo, en estas cepas se observó la detección de algún bacteriófago que originaba zonas de lisis líticas, que podría haber enmascarado la presencia del bacteriófago  $stx_2$ . De hecho, la mayoría de bacteriófagos  $stx_2$  suelen integrarse en forma de profago en el cromosoma bacteriano, originando unas zonas de lisis muy poco visibles (119).

En el caso contrario, no pudo observarse esta relación, de manera que el bacteriófago estaría implicado en la producción de proteína pero no sería el único factor a tener en cuenta. Esta falta de detección de producción de proteína en algunas cepas en las que sí que se detectaron bacteriófagos portadores del gen  $stx_2$  podría estar asociada a la falta de expresión del fago productor, o la poca sensibilidad del método utilizado para la detección de la producción de proteína. De hecho, la mayoría de las variantes que no fueron detectadas fueron la  $Stx_{2d}$  y la  $Stx_{2e}$ , a pesar de que en los controles utilizados sí que se detectó producción de estas, aunque con una menor intensidad respecto al resto de variantes. No obstante, a partir de los resultados obtenidos en las cepas transducidas, en las que se observaron diferencias en el nivel de expresión del gen  $stx_2$  en las nuevas cepas receptoras respecto a la cepa original, uno de los bacteriófagos transducidos era portador del gen  $stx_{2e}$ , detectándose en la cepa receptora producción de proteína.

Algunos de los bacteriófagos portadores del gen  $stx_2$  aislados de cepas de diferente origen presentaron un patrón de restricción similar, lo que sugiere que la lisogenización por transferencia horizontal de algunas de estas cepas ha sido un evento relativamente reciente o que están sujetos a mayores presiones selectivas.

La medida del ADN de los bacteriófagos analizados, se encuentra dentro de los valores descritos en estudios previos. Así pues, mientras que el tamaño

del ADN del fago H19 se estimó en 51 kb (176), el de los fagos  $\phi$ 32511 (VT2) fue de 68 kb y el de  $\phi$ 30480 (VT1) fue estimada en 70 kb (215). Valores más elevados fueron considerados como pertenecientes a dos bacteriófagos en la misma cepa, como es el caso de bacteriófagos que codifican para más de un gen *stx*.

En cuanto a los sitios de integración que son utilizados por estos bacteriófagos, los resultados obtenidos en este estudio sugieren también la existencia de una variabilidad ya que, según parece, más de un sitio de integración sería posible. Así pues, además de los sitios de integración inicialmente descritos, el bacteriófago 933W, portador del gen *stx*<sub>2</sub>, que se halla integrado en el locus del gen *wrbA* (150) y el bacteriófago VT1-Sakai integrado en el locus del gen *yehV* (219), recientemente se ha descrito el sitio de integración para una de las variantes del gen *stx*<sub>2e</sub> que, en una cepa de *E. coli* ONT:H<sup>-</sup>, se halla integrado en el locus *yecE* (154). El locus *scbB* también podría estar ocupado por bacteriófagos portadores del gen *stx*<sub>2</sub> en *E. coli* O157:H7 (193).

El hecho de que únicamente uno de los bacteriófagos analizados en este estudio esté integrado presumiblemente en el locus *wrbA* sugiere que, a parte de la variabilidad en el sitio de integración posiblemente asociada al tipo de variante de gen *stx*<sub>2</sub> del que es portador el bacteriófago, existe una variabilidad dentro de los bacteriófagos que son portadores de una misma variante, ya que otros bacteriófagos portadores de la misma variante no resultaron positivos. Sin embargo, a pesar de la existencia de diferentes bacteriófagos que utilicen diferentes sitios de integración, los resultados sugieren que podrían existir variaciones en la secuencia del sitio de integración o en la secuencia del extremo del bacteriófago, teniendo en cuenta que algunas de las cepas analizadas amplificaron para alguno de los extremos de unión entre el ADN del bacteriófago y bacteriano y que la secuenciación de estos amplímeros en algunas de las cepas ha demostrado la presencia de genes de bacteriófagos *stx*<sub>2</sub> (Muniesa, comunicación personal). Además, los datos obtenidos de los transductantes, como se discute a continuación, sugieren que el sitio de integración no viene determinado para un tipo concreto de bacteriófago ya que el mismo bacteriófago puede estar integrado en sitios diferentes en cepas diferentes. La secuenciación

del ADN de estos bacteriófagos podría aclarar la frecuencia con que cada uno de estos sitios de integración es utilizado.

Se obtuvieron transductantes para algunos de los bacteriófagos, tanto en una cepa de *Shigella sonnei* como en una cepa de *Escherichia coli*, que confirman los datos obtenidos anteriormente. No obstante, no se descarta que el resto de bacteriófagos que no consiguieron ser transducidos sí que pudieran serlo en ensayos realizados *in vivo* o con la cepa huésped adecuada. De hecho, según un estudio publicado recientemente, la eficiencia de la transducción es mayor *in vivo* (193) ya que, según parece, algunos factores presentes *in vivo* facilitarían la lisogenización (como el potencial de oxido-reducción, el pH o el oxígeno, entre otros).

En relación con los sitios de integración de estos bacteriófagos en las cepas transductantes, los resultados obtenidos sugieren que uno de los bacteriófagos transducidos se había insertado en el locus *yehV*, a pesar de que en la cepa original no se había detectado integración en este locus. Otro de los bacteriófagos, que anteriormente estaba integrado en el locus *wrbA*, se integró en el mismo locus, mientras que para el resto de bacteriófagos no se pudo establecer si se habían producido alteraciones en cuanto al sitio de integración respecto a la cepa original, ya que no amplificaron para ninguno de los extremos de los loci ensayados. Así pues, a la diversidad anteriormente mencionada (diferente fragmento *EcoRI* positivo para el gen *stx<sub>2</sub>* y presencia de diferentes variantes *stx<sub>2</sub>* en el genoma de estos bacteriófagos) hay que añadir esta diversidad de sitios de integración que es independiente del gen *stx<sub>2</sub>* del que son portadores.

La morfología de los bacteriófagos transducidos observada es similar a la de otros bacteriófagos descritos con anterioridad como el 933W (150) que presentaba cápsides hexagonales icosaédricas con colas cortas, o otros bacteriófagos, como el bacteriófago  $\phi$ H19 descrito por primera vez por Scotland *et al.* (176), portador del gen *stx<sub>1</sub>*, y descrito posteriormente también para el gen *stx<sub>2</sub>* (119), que presentaban cápsides alargadas hexagonales.

En los bacteriófagos analizados en este estudio, a pesar de que el número de transductantes obtenidos y analizados es relativamente pequeño para poder determinar diferencias estadísticamente significativas, no se observó ninguna relación entre el tipo de morfología y la presencia de una determinada variante *stx*. Así pues, el gen *stx*<sub>2</sub> se encontró asociado a los diferentes tipos de morfología. De la misma manera, otros bacteriófagos como el  $\phi$ 30480 (portador del gen *stx*<sub>1</sub>) y el  $\phi$ 32511 (portador del gen *stx*<sub>2</sub>) (215), presentaban cápsides regulares hexagonales y colas cortas contráctiles. De la misma manera, los bacteriófagos  $\phi$ SC370 y  $\phi$ LC159 (ambos portadores del gen *stx*<sub>2</sub>), presentaron las dos morfologías anteriormente descritas (119).

Hay que destacar que se observaron variaciones en cuanto al nivel de producción de toxina por un mismo bacteriófago en la nueva cepa huésped lisogenizada respecto a la cepa original de la que fue aislado inicialmente. Estas diferencias se vieron asociadas, además, a cambios en el nivel de inducción de los bacteriófagos. Si bien los valores de absorbancia tras el tratamiento con mitomicina no representan más que una medida indirecta de la inducción los bacteriófagos, sí que se observó una correlación positiva entre valores bajos de absorbancia y la presencia de bacteriófagos en las cepas originales. Además, se detectaron cepas transductantes que no eran capaces de producir toxina o, en todo caso, lo hacían a unos niveles no detectables mediante el kit utilizado para la detección de proteína Stx cuando en la cepa original sí que se había detectado producción de ésta. En estas cepas se observaron valores elevados de absorbancia, lo que era un indicativo de que en el nuevo entorno en el que se encontraban los bacteriófagos no eran capaces de inducirse mediante el tratamiento con mitomicina C. El motivo de esta falta de inducción se desconoce, pero sugiere que factores presentes en la célula huésped, por ejemplo la presencia de otros bacteriófagos, también podrían regular de alguna manera la inducción del bacteriófago. El efecto reverso también fue observado en un bacteriófago que presentó una mayor inducción en una cepa de *Shigella sonnei* que en la cepa original. Estas observaciones sugieren que la inducción de estos bacteriófagos contribuye a la producción de toxina, seguramente por traducción de los genes tardíos del bacteriófago ya que, como ha sido descrito, los genes *stx* se hallan codificados entre el gen que codifica la proteína Q y los genes que codifican las proteínas S y R, implicadas en la lisis de la bacteria (198). Las

diferencias en cuanto a la producción de toxina por diferentes bacteriófagos *stx*<sub>2</sub> transducidos en una misma cepa, han sido previamente descritas (201).

En cualquier caso, como resultado de este estudio cabe destacar la presencia de bacteriófagos similares a los descritos en cepas aisladas de brotes en muchos de los serotipos que han sido identificados en este estudio, a pesar de no haber sido asociados a patología. Sin embargo, hay que destacar también la elevada variabilidad de estos bacteriófagos en cuanto al espectro de huéspedes y el patrón RFLP observado.

El hecho de que un mismo bacteriófago pueda conferir mayor o menor grado de virulencia a una determinada cepa, podría ser un factor importante en la generación de diversos serotipos STEC con diferentes grados de patogenicidad, algunos de los cuales no han sido nunca asociados a enfermedad en humanos. Este mayor o menor grado de virulencia no sólo depende del propio bacteriófago sino también de su entorno genético, que de alguna manera interactúa con él. No obstante, como se ha indicado a lo largo de este estudio, el desarrollo de la enfermedad es un proceso multifactorial, por lo que se hace muy difícil el estudio de todos los factores implicados.

## DISCUSIÓN FINAL

---



## Discusión final

La elevada diversidad de serotipos de *E. coli* portadores del gen *stx*<sub>2</sub> que han sido descritos en las últimas décadas en los diferentes continentes, sugiere una eficiencia de transmisión de este gen muy elevada entre los individuos de las diferentes poblaciones microbianas. Si bien el reservorio principal de estas cepas lo constituyen los animales, principalmente el ganado bovino, también se ha observado una elevada diversidad de estos serotipos en casos esporádicos de colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico, por lo que las aguas residuales tanto humanas como animales podrían contribuir al mantenimiento de estas cepas en el medio ambiente, posibilitando la recolonización del intestino al entrar de nuevo en contacto con ellas.

Los resultados obtenidos muestran una elevada diversidad cepas STEC presentes en estos ambientes acuáticos, sugiriendo que estos ambientes, en cierta manera, podrían actuar como reservorio, no sólo de estas cepas y del gen *stx*<sub>2</sub>, sino también de otros genes de virulencia implicados en patogénesis en humanos como el *stx*<sub>1</sub>, *eaeA*, el *hlyA* y el *saa* que también han sido detectados. De manera similar, en un estudio publicado recientemente (199) se llegan a las mismas conclusiones.

Utilizando el método de la PCR anidada en combinación con la técnica del NMP, el gen *stx*<sub>2</sub> fue detectado en todas las muestras de agua residual analizadas independientemente de su origen. La presencia de este gen en la fracción bacteriana de estas aguas fue confirmada, posteriormente, tras la detección de estas cepas mediante la técnica de la hibridación colonial y el subsiguiente aislamiento de las mismas. Los valores obtenidos indicaron que estas cepas están presentes y representan una elevada proporción (aproximadamente del 0,1%) de las cepas de *E. coli* en la zona geográfica de Catalunya, independientemente del tamaño de la población del que son representativas estas aguas residuales. Estas cepas son igualmente frecuentes en las aguas residuales de mataderos de animales (bovinos, porcinos y mixtos), siendo más abundantes en el agua residual de matadero bovino (aproximadamente del 1%).

No se observó una variación estacional de las concentraciones de las cepas *stx*<sub>2</sub> en las muestras de agua residual urbana, aunque no se descarta que exista esta variación en muestras de agua residual de animales, tal como sucede con el caso del serotipo O157:H7 en cuanto a la excreción de este serotipo y la aparición de brotes.

Del mismo modo, estas cepas no se muestran más resistentes a los diferentes tratamientos de depuración del agua residual de lo que se muestran los indicadores bacterianos estudiados.

Tras la caracterización fenotípica de las cepas aisladas se observó que el serotipo O157:H7 no era uno de los más prevalentes en esta región. Con el fin de confirmarlo, se utilizó un sistema de detección selectivo para estas cepas que posibilitara su aislamiento para su posterior identificación. Así pues, los resultados obtenidos de la enumeración de las cepas pertenecientes a este serotipo mostraron que, efectivamente los otros serotipos STEC no-O157 son más prevalentes en las muestras de agua residual analizadas. Únicamente fueron detectados en muestras de agua residual de matadero bovino, ya que las cepas aisladas mediante el método selectivo del agua residual urbana y de matadero porcino no presentaron el antígeno flagelar H7 ni el gen *stx*<sub>2</sub> ni ninguna de sus variantes.

Las cepas de *E. coli* O157:H7 presentaron el fenotipo esperado, fermentadoras de sorbitol y ausencia de actividad β-D-glucuronidasa, aunque no hay que olvidar que la variante no mótil ha sido asociada a enfermedad en humanos (23) y sí que fermenta el sorbitol y produce actividad β-D-glucuronidasa, por lo que la detección de este serotipo no puede basarse exclusivamente en la detección de estas dos características.

Con el fin de comprobar si la diferencia de serotipos estaba asociada con una heterogeneidad genética en cuanto al gen *stx*<sub>2</sub> se analizó la presencia de las diferentes variantes del gen *stx*<sub>2</sub> en los diferentes serotipos analizados. Se detectaron cuatro de las cinco principales variantes descritas (*stx*<sub>2r</sub>, *stx*<sub>2cr</sub>, *stx*<sub>2d</sub> y *stx*<sub>2e</sub>) y la recientemente descrita *stx*<sub>2g</sub> (100), cada una de ellas asociada

mayoritariamente con un tipo de muestra de acuerdo con estudios anteriores presentados por otros autores.

Se ha podido detectar más de una copia del gen *stx*<sub>2</sub> en una misma cepa, lo cual sugiere que si éstos genes están codificados en bacteriófagos, deben existir suficientes diferencias entre los bacteriófagos que posibiliten la infección de una cepa por dos bacteriófagos al mismo tiempo.

Como se ha indicado anteriormente se ha podido detectar también el gen *stx*<sub>1</sub>. No obstante, se observaron diferencias en cuanto a la funcionalidad de los genes *stx*<sub>1</sub> y *stx*<sub>2</sub>. Así pues, mientras que se detectó producción de proteína Stx<sub>1</sub> en la mayoría de las muestras, no pudo detectarse producción de Stx<sub>2</sub> en la mayoría de cepas aisladas de agua residual urbana. Esto podría estar relacionado con una mayor diversidad del gen *stx*<sub>2</sub> respecto al gen *stx*<sub>1</sub>. No obstante, según diversos autores, la producción de proteína Stx, ha sido asociada con la inducción de los bacteriófagos atemperados que se encuentran integrados en el cromosoma de estas cepas, por lo que la presencia de bacteriófagos defectivos podría explicar algunos de los casos en los que no se detectó producción de proteína Stx<sub>2</sub>.

Como se ha indicado anteriormente, el único serotipo que presentó el gen *eaeA* y el *ehxA* fue el de *E. coli* O157:H7. No hay indicios, pues, de que el resto de serotipos representen cepas patogénicas para los humanos. No obstante, la falta de modelos que mimeticen los mismos efectos que los causados en los humanos hace difícil el estudio de los mecanismos implicados en la patogenicidad en humanos, por lo que no se puede descartar que estas cepas pudieran poseer otros factores de virulencia que no hayan sido aún descritos.

Se confirmó la presencia de bacteriófagos portadores del gen *stx*<sub>2</sub> en algunas de las cepas, mayoritariamente en las cepas aisladas de animales, mediante las técnicas descritas en la memoria. Posiblemente, se trate de que estas cepas hayan sufrido menos modificaciones al haber sido aisladas de su reservorio principal, o las cepas aisladas de agua residual de matadero bovino sean el reservorio natural de los bacteriófagos portadores del gen *stx*<sub>2</sub>.

Se detectó una elevada diversidad de bacteriófagos inducidos en cuanto al nivel de inducción, al patrón RFLP del ADN de estos bacteriófagos y al espectro de huéspedes que presentaron. No obstante, aunque no todos estos bacteriófagos fueron identificados como bacteriófagos portadores del gen *stx<sub>2</sub>*, aquellos en los que sí que se demostró la presencia del gen *stx<sub>2</sub>* o de alguna de sus variantes se observó variabilidad en el tamaño del fragmento *EcoRI* en el que se detectó el gen *stx<sub>2</sub>*, lo que sugiere que estos bacteriófagos son diferentes. Estas diferencias también se reflejaron en el espectro de huéspedes que presentaron así como en el hecho de cada uno presentó una determinada variante del gen *stx<sub>2</sub>*.

La transducción es difícil de llevar a cabo en el laboratorio al no disponer de métodos selectivos para los transductantes. Sin embargo, se consiguieron transductantes con 7 de los bacteriófagos estudiados. A partir de los datos obtenidos de estos transductantes se pudieron confirmar las diferencias entre estos bacteriófagos en cuanto a las diferentes variantes del gen *stx<sub>2</sub>* de las que son portadores. Así pues, estos bacteriófagos eran portadores del gen *stx<sub>2</sub>* (1 bacteriófago), *stx<sub>2c</sub>* (4 bacteriófagos) y *stx<sub>2e</sub>* (2 bacteriófagos). Los sitios de integración de los bacteriófagos también mostraron cierta variabilidad.

En conclusión, a pesar de que los datos epidemiológicos de España sugieren que la infección por cepas STEC no se produce con una elevada frecuencia, no hay que olvidar que el gen *stx<sub>2</sub>* se encuentra ampliamente distribuido en un gran número de cepas, tanto de origen animal como humano, y que la vehiculización de este gen mediada por bacteriófagos podría acelerar de alguna manera la emergencia de nuevos serotipos patogénicos. La mayoría de las cepas aisladas en este estudio podrían representar etapas intermedias en la emergencia de nuevos serotipos virulentos o podrían contribuir al mantenimiento de estos genes, que en un momento determinado podrían ser transmitidos a otras bacterias. Por tanto, la monitorización de estas cepas podría ser importante para la prevención de riesgos epidemiológicos en la población. Este estudio apunta a la necesidad de utilizar sistemas de detección que no sean del todo selectivos, ya que las cepas presentes en el medio ambiente no son necesariamente las más frecuentemente aisladas en los hospitales y alimentos, y

de hecho son las cepas con las que quizás nos enfrentaremos en un futuro más o menos cercano.

A parte de la problemática relacionada con la emergencia de estos nuevos serotipos virulentos, es importante mantener unas medidas preventivas, principalmente higiénicas en la manipulación de los alimentos y de concienciación de la población en general para mantener unos buenos hábitos en la elaboración de los alimentos antes de ser consumidos.



## CONCLUSIONES



- El método del NMP en combinación con la técnica de la PCR anidada resulta útil para la cuantificación de bacterias portadoras del gen *stx*<sub>2</sub> que no comparten unas características fenotípicas comunes y diferenciales del resto de microorganismos.
- Existen bacterias portadoras del gen *stx*<sub>2</sub> de forma habitual en las aguas residuales urbanas y de mataderos.
- El número estimado de bacterias portadoras del gen *stx*<sub>2</sub> en agua residual urbana oscila entre 10<sup>1</sup> y 10<sup>2</sup> bacterias/ml, mientras que en el agua residual de matadero lo hace entre 10<sup>2</sup> y 10<sup>3</sup> bacterias/ml.
- Las bacterias portadoras del gen *stx*<sub>2</sub> se encuentran en una proporción bastante constante respecto a los indicadores de contaminación fecal, sin observarse variaciones estacionales en el agua residual urbana.
- Las bacterias portadoras del gen *stx*<sub>2</sub> no son especialmente resistentes a los tratamientos utilizados en la depuración del agua residual.
- La siembra de las muestras sobre placas agar Chromocult® de 140 mm y la hibridación colonial con la sonda de 378 pb es un método eficaz para la cuantificación y el aislamiento de bacterias portadoras del gen *stx*<sub>2</sub> pertenecientes a cualquier serotipo.
- La metodología descrita podría ser una herramienta útil para el estudio de la ecología del gen *stx*<sub>2</sub> en ambientes extraintestinales, su persistencia y difusión entre las diferentes poblaciones bacterianas.
- En las aguas residuales abundan una gran variedad de serotipos STEC diferentes del O157:H7 que podrían actuar como reservorio del gen en el medio ambiente. Dentro del grupo coliforme *E. coli* es la especie más abundante portadora del gen *stx*<sub>2</sub>.
- La detección del serotipo O157:H7 mediante la separación inmunomagnética, seguida de la siembra en agar CT-SMAC y la detección inmunológica del

antígeno O157, reduce el número de falsos positivos que se obtienen en este tipo de muestras.

- La técnica utilizada ha permitido la detección de 9 serotipos STEC que no habían sido descritos con anterioridad. Estos son el O2:H2, O8:H31, O89:H19, O127:H<sup>-</sup>, O162:H7, O166:H21, O177:H<sup>-</sup>, O181:H20 y O181:H49.
- Los diferentes serotipos STEC presentan gran variabilidad en cuanto a la combinación de diferentes genes de virulencia (*stx<sub>1</sub>*, *ehxA*, *saa* y *eaeA*), lo que podría indicar el movimiento de estos genes entre las diferentes poblaciones bacterianas. El movimiento de estos genes, incluido el del gen *stx<sub>2</sub>*, podría contribuir a la emergencia de nuevos patógenos.
- La mayoría de las cepas STEC aisladas presentan bacteriófagos inducibles. Algunos de estos bacteriófagos son portadores del gen *stx<sub>2</sub>*.
- Las cepas aisladas de agua residual de matadero bovino presentan mayor número de bacteriófagos *stx<sub>2</sub>* inducibles, lo cual está relacionado con el mayor número de cepas aisladas de este origen en las que se detectó producción de proteína Stx<sub>2</sub>.
- Los bacteriófagos portadores del gen *stx<sub>2</sub>* presentan variabilidad en cuanto a su capacidad de infectar a diferentes cepas huésped. Además, estos bacteriófagos son portadores de diferentes variantes *stx<sub>2</sub>*, presentan patrones RFLP variados y utilizan sitios de integración diferentes en la célula huésped.
- Se han observado dos morfologías diferentes asociadas con estos bacteriófagos: cápsides icosaédricas hexagonales con colas cortas y cápsides alargadas con colas largas independientemente de la variante *stx<sub>2</sub>* de la que son portadores.
- La diversidad de bacteriófagos portadores del gen *stx<sub>2</sub>* observada podría contribuir a la dispersión del gen *stx<sub>2</sub>* entre las diferentes poblaciones bacterianas.

## ANEXO I

*"Resumen de los resultados del Capítulo II y III"*



Cepa <sup>(a)</sup>	Origen	Serotipo	variante gen <i>stx2</i>											Lisado Fágico									
			<i>stx1</i>		variante gen <i>stx2</i>									Inducción		Espectro		Digestión <i>EcoRI</i>		Locus inserción		Morfología	
			<i>stx1</i>	<i>Stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>stx2c</i>	<i>stx2d</i>	<i>stx2e</i>	<i>stx2f</i>	<i>stx2g</i>	<i>Stx2</i>	<i>eaeA</i>	<i>hlyA</i>	<i>saa</i>	DO <sub>600 nm</sub>	<i>stx2</i> (PCR)	ZL <sup>(b)</sup>	<i>stx2</i>	RFLP	Southern	<i>wrbA</i>	<i>yehV</i>	fago mayoritario
S8	H	O146:H-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	0,1	+	+	+	+	4,9 kb	CG/DH	-	933W
S48	M	ONT:H21	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	0,9	+	+	+	+	-	-	-	933W/A
S49	M	O26:H-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	1,0	+	+	-	-	-	-	-	NE
S50	M	O175:H16	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	0,1	-	+	-	-	-	-	-	NE
S51	H	O146:H21	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	0,4	-	+	-	+	-	CG	-	933W
S52	H	O171:H2	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	0,8	+	+	-	-	-	-	-	NE
S53	H	O171:H2	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,3	-	+	-	-	-	-	-	NE
S54	H	O8:H9	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	0,7	+	+	-	-	-	-	-	NE
S55	H	O127:H-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	0,4	+	+	-	+	-	CG	BF	NE
S56	H	O70:H-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	0,5	-	+	-	-	-	-	-	NE
S57	B	O171:H2	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	0,6	+	+	+	-	-	-	-	NE
58	B	O171:H2	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	0,5	+	+	+	+	-	-	-	H19
S59	B	O171:H2	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	1,1	+	-	-	-	-	-	-	NE
62	B	O171:H2	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	0,3	+	+	+	+	12 kb	-	-	933W/H19
S63	B	O171:H2	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	0,4	+	+	+	+	12 kb	-	-	933W/H19
S64	B	O171:H2	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	0,5	+	+	+	+	12 kb	-	-	933W
S67	B	O171:H2	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	0,2	+	+	+	+	12 kb	-	-	H19
S68	B	O89:H19	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	0,4	-	+	-	-	-	-	-	NE
S69	B	O181:H49	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	0,6	+	+	+	+	-	-	-	ND
S70	B	O162:H7	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	0,6	+	+	+	+	-	CG	-	NE
S72	B	O181:H20	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	0,1	+	+	+	+	12 kb	-	-	933W
S73	B	O181:H20	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	0,4	+	+	+	+	12 kb	-	-	933W
S74	B	O171:H2	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	0,2	+	+	+	+	12 kb	-	-	933W
S75	P	O2:H21	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	0,2	+	+	-	+	-	-	-	NE
S76	P	O54:H21	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	0,3	-	+	-	+	-	-	-	NE
S77	H	O90:H-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	0,5	+	+	-	+	-	CG	BF	ND
S78	H	O166:H21	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	0,2	+	+	+	+	-	-	-	ND
S79	H	O90:H-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	0,4	+	+	+	+	12 kb	-	-	933W

## Conclusiones

Cepa	Origen	Serotipo	<i>stx</i> <sub>1</sub>		<i>stx</i> <sub>2</sub>	variante <i>stx</i> <sub>2</sub>						<i>eevA</i>	<i>hlyA</i>	<i>saa</i>	Inducción		Espectro		Digestión <i>EcoRI</i>		Locus inserción		Morfología fago mayoritario
			<i>stx</i> <sub>1</sub>	<i>Stx</i> <sub>1</sub>		<i>stx</i> <sub>2c</sub>	<i>stx</i> <sub>2d</sub>	<i>stx</i> <sub>2e</sub>	<i>stx</i> <sub>2f</sub>	<i>stx</i> <sub>2g</sub>	<i>Stx</i> <sub>2</sub>				DO <sub>600nm</sub>	<i>stx</i> <sub>2</sub> (PCR)	ZL <sup>(b)</sup>	<i>stx</i> <sub>2</sub>	RFLP	Southern	<i>wrbA</i>	<i>yehV</i>	
S80	H	ONT:H9	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	1,1	+	+	+	-	-	-	-	NE
S82	B	O171:H2	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	0,4	+	+	+	-	-	-	BF	933W
S85	B	O171:H2	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	0,5	+	+	+	-	-	-	BF	933W/H19
S86	B	O2:H25	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	0,4	+	+	+	+	-	-	-	H19
S90	B	O2:H2	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	0,4	+	+	+	+	-	-	-	933W
S91	B	O2:H25	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	0,5	+	+	+	+	12 kb	-	-	933W
S93	B	O2:H25	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	0,7	+	+	+	+	-	-	-	933W
S94	B	O98:HNT	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	0,8	+	+	+	+	15 kb	-	-	933W
S96	B	ONT:H-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	0,8	+	+	-	+	-	-	-	NE
S98	B	O136:H1	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	0,2	+	+	+	+	-	-	-	NE
S99	B	ONT:HNT	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	0,9	+	+	-	+	-	-	-	NE
S102	B	O8:H31	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	0,5	-	+	-	+	-	-	-	NE
S106	B	O171:H2	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	0,2	+	+	-	+	15 kb	-	-	933W/B
S107	B	O2:H25	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	0,8	+	+	+	+	12 kb	-	-	933W
S108	B	O171:H2	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	0,8	+	+	+	+	-	-	-	ND
S109	B	O113:H21	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	0,2	+	+	+	+	6 kb	-	BF	933W
S110	B	O157:H-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	0,7	+	+	+	+	6 kb	-	BF	933W/H19
S113	B	O171:H2	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	0,4	+	+	+	-	-	-	BF	ND
S114	B	O22:H8	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	0,4	+	+	-	+	-	-	BF	933W
S115	B	O91:H21	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	0,7	+	+	+	+	6/4,9 kb	-	BF	933W
S116	B	O76:H2	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	0,4	+	+	-	+	-	-	-	933W/B
S119	H	O90:H-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	0,6	+	+	-	+	-	-	-	NE
S120	H	O8:H9	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	1,2	+	+	-	-	-	-	-	NE
S121	H	O8:H9	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	0,8	+	+	-	+	-	-	-	NE
S124	B	O1:H20	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	0,5	+	+	+	+	18 kb	-	-	H19
S125	B	O1:H20	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	0,5	+	+	+	+	18 kb	-	-	933W/H19
S126	B	O22:H8	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	0,8	-	+	-	+	-	-	BF	ND

Cepa	Origen	Serotipo	stx <sub>1</sub>		stx <sub>2</sub>	variante stx <sub>2</sub>					eaeA	hlyA	saa	Inducción		Espectro		Lisado Fágico		Locus inserción		Morfología
			stx <sub>1</sub>	Stx <sub>1</sub>		stx <sub>2c</sub>	stx <sub>2d</sub>	stx <sub>2e</sub>	stx <sub>2f</sub>	stx <sub>2g</sub>				Stx <sub>2</sub>	DO <sub>600 nm</sub>	stx <sub>2</sub> (PCR)	ZL	stx <sub>2</sub>	RFLP	Southern	wrbA	yehV
S133	M	O90:H-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	0,8	+	+	+	+	-	CG	-	933W
S134	M	O2:H25	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	0,7	+	+	+	+	12 kb	-	-	933W
S138	M	ONT:H-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	0,8	+	+	-	-	-	-	-	NE
S140	M	ONT:H-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	0,5	+	+	-	+	-	-	-	NE
S141	M	ONT:H-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	0,3	+	+	-	+	-	-	-	NE
S146	M	O177:H-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	0,6	-	+	-	+	-	-	-	NE
S147	P	O159:H-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	0,2	+	+	+	+	-	-	-	ND
S148	P	O100:H-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	0,5	+	+	+	+	11 kb	-	-	ND
S149	P	O8:H-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	1,0	+	+	-	+	-	-	-	NE
S150	P	O26:H-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	1,1	+	+	+	+	12 kb	-	-	ND
O3	B	O157:H7	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	0,7	+	+	+	+	6 kb	-	BF	H19
O9	B	O157:H7	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	0,8	+	+	+	+	6 kb	-	BF	H19
O16	B	O157:H7	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	0,7	+	+	+	+	6 kb	-	BF	933W
O17	B	O157:H7	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	0,7	+	+	+	+	6 kb	-	BF	933W
O22	B	O157:H7	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	0,9	+	+	+	+	6 kb	-	BF	933W
O24	B	O157:H7	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	0,9	+	+	+	+	6 kb	-	BF	933W
O29	B	O157:H7	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	0,6	+	+	+	+	6 kb	-	BF	933W
O58	B	O157:H7	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	0,9	+	+	+	+	6 kb	-	BF	933W
O63	B	O157:H7	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	0,5	+	+	+	+	6 kb	-	BF	933W
O67	B	O157:H7	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	0,6	+	+	+	+	6 kb	-	BF	933W/H19
O69	B	O157:H7	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	0,8	+	+	+	+	6 kb	-	BF	H19
O72	B	O157:H7	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	0,9	+	+	+	+	6 kb	-	BF	933W/H19
O73	B	O157:H7	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	0,7	+	+	-	+	-	-	BF	NE
O84	B	O157:H7	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	0,6	+	+	+	+	6 kb	-	BF	933W
<b>TOTAL cepas positivas</b>			<b>15</b>	<b>13</b>	<b>12</b>	<b>39</b>	<b>9</b>	<b>17</b>	<b>0</b>	<b>8</b>	<b>42</b>	<b>15</b>	<b>25</b>	<b>5</b>	<b>70</b>	<b>78</b>	<b>50</b>	<b>64</b>	<b>34</b>			

(<sup>a</sup>) Cepa aislada de la que fueron inducidos los bacteriófagos; (<sup>b</sup>) Detección de zona de lisis en alguna de las cepas huésped ensayadas; **H**, agua residual urbana; **B**, agua residual de bovinos; **P**, agua residual de porcinos; **M**, agua residual mixta; **ND**, no detectado; **NE**, no estudiado; **933W**, cápsides hexagonales icosaédricas y cola corta; **H19**, cápsides alargadas y colas largas; **A**, cápsides hexagonales icosaédricas y cola contráctil; **B**, cápsides ligeramente más alargadas que en el caso del bacteriófago 933W y cola corta.



## ANEXO II

---

*"Cebadores utilizados para la detección del gen  $stx_1$ , el gen  $stx_2$  y sus variantes"*



Cebador	Secuencia (5'-3')	Gen	Tamaño del amplímero de PCR (pb)	Referencia
UP 378	GCGTTTTGACCATCTTCGT	<i>stx<sub>2</sub></i> (fragmento genérico)	378	Muniesa y Jofre, 1998
LP 378	ACAGGAGCAGTTTCAGACAG			
IUP	TAATACGGCAACAAATACT			
ILP	TGATGAAACCAGTGAGTGA	PCR anidada	169	Muniesa y Jofre, 1998
S2Aup	ATGAAGTGATATTATTTA	subunidad A gen <i>stx<sub>2</sub></i> (secuenciación)	978	Muniesa <i>et al.</i> , 2003
S2Alp	TTCTTCATGCTTAACTCCT			
<i>Stx<sub>2</sub></i> -a	GCGGTTTTATTTGCATTAGC	<i>stx<sub>2</sub></i>	115	Wang <i>et al.</i> , 2002
<i>Stx<sub>2</sub></i> -b	TCCCGTCAACCTTCACTGTA			
<i>Stx<sub>2c</sub></i> -a	GCGGTTTTATTTGCATTAGT	<i>stx<sub>2c</sub></i>	124	Wang <i>et al.</i> , 2002
<i>Stx<sub>2c</sub></i> -b	AGTACTCTTTTCCGGCCACT			
<i>Stx<sub>2d</sub></i> -a	GGTAAAATTGAGTTCTCTAAGTAT	<i>stx<sub>2d</sub></i>	175	Wang <i>et al.</i> , 2002
<i>Stx<sub>2d</sub></i> -b	CAGCAAATCCTGAACCTGACG			
<i>Stx<sub>2e</sub></i> -a	ATGAAGTGATATTGTTAAAGTGGA	<i>stx<sub>2e</sub></i>	303	Wang <i>et al.</i> , 2002
<i>Stx<sub>2e</sub></i> -b	AGCCACATATAAATTATTTTCGT			
<i>Stx<sub>2f</sub></i> -a	TGTCTTCAGCATCTTATGCAG	<i>stx<sub>2f</sub></i>	150	Wang <i>et al.</i> , 2002
<i>Stx<sub>2f</sub></i> -b	CATGATTAATTACTGAAACAGAAA			
209F	GTTATATTTCTGTGGATATC	<i>stx<sub>2g</sub></i>	573	Leung <i>et al.</i> , 2003
781R	GAATAACCGCTACAGTA			
<i>Stx<sub>1</sub></i> -a	TCTCAGTGGGCGTTCTTATG	<i>stx<sub>1</sub></i>	338	Wang <i>et al.</i> , 2002
<i>Stx<sub>1</sub></i> -b	TACCCCTCAACTGCTAATA			

Cebadores utilizados para la detección mediante PCR de cada una de las variantes del gen *stx* ensayadas en este estudio (a y b, cebadores "forward" y "reverse", respectivamente).



## ANEXO III

---

### *"Materiales y Métodos generales"*



## 1.1. Preparación de Medios

- **Caldo LB ("Luria-Bertani")**

NaCl	10 g
Extracto de levadura	5 g
Bacto-Triptona	10 g
Agua destilada	1 l

Ajustar el pH a 7,5 añadiendo NaOH. Esterilizar 20 minutos a 121 °C.  
Conservar a 4 °C.

- **Agar LB**

NaCl	10 g
Extracto de levadura	5 g
Bacto-Triptona	10 g
Agua destilada	1 l
Agar agar	15 g

Ajustar el pH a 7,5 añadiendo NaOH. Esterilizar 20 minutos a 121 °C.  
Dejar enfriar hasta 55 °C y verter en placas. Dejar solidificar y  
conservar a 4 °C.

- **Agar LB semisólido**

NaCl	10 g
Extracto de levadura	5 g
Bacto-Triptona	10 g
Agua destilada	1 l
Agar agar	7 g

Ajustar el pH a 7,5 añadiendo NaOH. Esterilizar 20 minutos a 121 °C.  
Conservar a 4 °C.

- **Ringer 1/4**

Disolver una pastilla de R1/4 (Oxoid) en 500 ml de agua destilada.  
Esterilizar a 121 °C durante 20 min.

- **TSA ("Tryptic Soy Agar")**

Peptona de caseína	15 g
Peptona de soja	5 g
NaCl	5 g
Agar-agar	15 g
H <sub>2</sub> O d	1l

Esterilizar a 121 °C durante 20 min. Dejar enfriar hasta aproximadamente 55 °C y vertir en placas.

- **TSB ("Tryptic Soy Broth")**

Peptona de caseína	15 g
Peptona de soja	5 g
NaCl	5 g
H <sub>2</sub> O d	1l

Esterilizar a 121 °C durante 20 min. Conservar a 4 °C.

- **Agar Chromocult**

Peptona	3,0 g
NaCl	5,0 g
Dihidrógenofosfato	2,2 g
Hidrógenofosfato di-sódico	2,7 g
Triptófano	1,0 g
Piruvato sódico	1,0 g
Tergitol® 7	0,15 g
Sorbitol	1,0 g
Mezcla cromógena	0,4 g
Agar agar	10 g

Disolver 26,5 g en 1 l de H<sub>2</sub>O d. Llevar a ebullición agitando frecuentemente. Dejar enfriar hasta 55 °C y verter en placas. Dejar solidificar y conservar a 4 °C.

- **Agar mFC ("modified Fecal Coliform")**

Digerido pancreático de caseína	6,0 g
Peptona de proteosa N° 3	9,0 g
Extracto de levadura	3,0 g
Lactosa	12,5 g
Sales biliares N°3	1,5 g
NaCl	5,0 g
Agar agar	15,0 g
Azul de anilina	0,1 g

Disolver 52 g en 1 l de H<sub>2</sub>O d. Llevar a ebullición agitando frecuentemente. Agregar 10 ml de ácido rosólico en 0,2 N NaOH. Seguir calentándolo durante 1 min. Ajustar el pH a 7,4 si es necesario con 1 N HCl. Dejar enfriar hasta 55 °C y verter en placas. Dejar solidificar y conservar a 4 °C.

- **Agar CT-SMAC ("Cefixime Tellurite Sorbitol MacConkey")**

Peptona	20 g
NaCl	5 g
Sales biliares número 3	1,50 g
Sorbitol	10 g
Rojo neutro	0,03 g
Cristal violeta	0,001 g
Agar agar	10 g

Disolver 25,8 g en 1l de H<sub>2</sub>O d. Esterilizar a 121 °C durante 20 min. Dejar enfriar a 55 °C y añadir el suplemento CT. Verter en placas, dejar solidificar y conservar a 4 °C.

- **Caldo CAYE ("Casamianoacid Yeast Extract")**

Casaminoácidos	20 g
Extracto de levadura	6 g
D(+)-glucosa	2,5 g
NaCl	2,5 g
Hidrógenofosfato di-sódico	8,71 g
MgSO <sub>4</sub>	0,05 g
MnCl <sub>2</sub>	0,005 g

Disolver 7,95 g en 200 ml de H<sub>2</sub>O d. Esterilizar a 121 °C durante 20 min. Añadir 1 ml del suplemento CAYE en condiciones estériles. Guardar a 4 °C.

- **Medio para el fenotipado bioquímico mediante el Phene Plate System®**

**Solución *stock* indicadora:**

Azul de bromotimol	1,1 g
NaOH 1M	10 ml
H <sub>2</sub> O d	90 ml

Disolver por agitación. Añadir 900 ml de H<sub>2</sub>O d. Esterilizar a 121 °C durante 20 min. Comprobar que la DO<sub>620 nm</sub> = 2,0-2,4 diluyendo (1:10) una alícuota de la solución *stock* indicadora en tampón fosfato 0,05 M (pH=7,5), y realizando la lectura en el espectrofotómetro.

**Medio de suspensión:**

Peptona	0,5 g
NaCl	20 g
Solución <i>stock</i> indicadora	100 ml
H <sub>2</sub> O d	900 ml

Preparar en condiciones estériles. El pH tiene que quedar entre 7,5 y 7,8. Comprobar que la DO<sub>620 nm</sub> = 1,9-2,3 mezclando 9,5 ml del medio de suspensión con 0,5 ml de tampón fosfato 0,05 M (pH=7,5), y realizando la lectura en el espectrofotómetro.

## 1.2. Preparación de Reactivos y Soluciones

### Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa

- **Solución de bromuro de etidio**

**Stock:**

Bromuro de etidio	200 mg
DMSO (Dimetilsulfóxido)	10 ml
Etanol absoluto	90 ml

Guardar a 4 °C protegido de la luz. Manipular siempre con guantes. Producto potencialmente cancerígeno.

**Solución para la tinción de geles de agarosa:**

Solución <i>stock</i>	50 µl
H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	200 ml

Guardar a temperatura ambiente protegido de la luz. Manipular siempre con guantes. Producto potencialmente cancerígeno

- **TBE ("Tris Borate EDTA") 10X:**

Tris base	109 g
Ácido bórico	55,6 g
EDTA	9,2 g

Disolver por agitación. Acabar de enrasar con agua bidestilada hasta 1000 ml. Ajustar el pH a 8,3. Esterilizar 20 minutos a 121 °C guardar a temperatura ambiente.

- **TBE 1X:**

Disolver 1/10 la solución TBE 10X con agua bidestilada estéril. Mezclar por agitación. Preparar inmediatamente antes de utilizar.

- **Preparación de geles de agarosa:**

Disolver la cantidad de agarosa necesaria en 100 ml de TBE 1X (p/v) en una botellas de vidrio. Agitar y disolver la agarosa por calor mediante la utilización de un horno microondas, durante aproximadamente 5 min a nivel bajo. La agarosa disuelta presenta un aspecto transparente y homogéneo sin grumos. Dejar reposar la agarosa hasta que se enfríe (aproximadamente 50 °C y verirla sobre la cubeta.

- **Marcadores de peso molecular de ADN**

Marcador PhiX174 *Hae*III (de 72 a 1353 pb), marcador Lambda *Eco*RI/*Hind*III (de 831 pb a 21,2 Kb) (Promega) y Marcador 1 Kb plus (de 100 pb a 12 Kb) (Invitrogen)

### **Hibridación colonial ADN-ADN**

- **Solución desnaturizante (hibridación colonial)**

NaOH	0,5 N
NaCl	1,5 M

Disolver por agitación. Esterilizar a 121 °C durante 20 min. Guardar a temperatura ambiente.

- **Solución neutralizante (hibridación colonial)**

Tris-HCl (pH=7,4)	1M
NaCl	1,5 M

Disolver por agitación. Esterilizar a 121 °C durante 20 min. Guardar a temperatura ambiente.

- **Solución Proteinasa K (hibridación colonial)**

Tris-HCl (pH=8,5)	50 mM
NaCl	100mM
EDTA	50 mM
Na-laurilsarcosina	1% (p/v)

Proteinasa K (Roche Diagnostics) 250 µg/ml

Preparar inmediatamente antes de utilizar. Mezclar por agitación.

### **Detección de sonda marcada con digoxigenina**

- **Tampón 1 (Ácido maleico 100 mM, NaCl 150 mM, pH=7,5)**

Ácido maleico	11,6 g
NaCl	8,8 g

Ajustar a 1 l con agua bidestilada. Ajustar el pH a 7,5 con pastillas de NaOH y esterilizar a 121 °C durante 20 minutos. Guardar a 4 °C.

- **Tampón de lavado (Tampón 1, Tween 20 0,3% (p/v))**

Tampón 1	1 l
Tween 20	3 g

Esterilizar a 121 °C durante 20 minutos. Guardar a 4 °C.

- **Tampón 2 (Agente bloqueante 1% (p/v), Tampón 1)**

Agente bloqueante	50 ml
Tampón 1	450 ml

Preparar utilizando material estéril. Es estable durante 2 semanas. Guardar a 4 °C.

- **Agente bloqueante 10% (p/v) en tampón 1**

Agente bloqueante	10 g
Tampón 1	100 ml

Esterilizar 20 minutos a 121 °C. Guardar a 4 °C.

- **Tampón 3 de revelado (Tris-HCl 100 mM (pH=9,5), NaCl 100 mM)**

Tris-HCl 1 M, pH=9,5	50 ml
NaCl 5M	10 ml
Agua bidestilada estéril	440 ml

Preparar con material estéril. Guardar a 4 °C.

- **Tampón de hibridación (SSC 5X, Na-laurilsarcosina 0,1% (p/v), SDS 0,02% (p/v), Agente bloqueante 2% (p/v))**

SCC 20X	62,5 ml
Agente bloqueante 10% (p/v)	50 ml
Na-laurilsarcosina 10% (p/v)	2,5 ml
SDS 10% (p/v)	0,5 ml
Agua bidestilada estéril	134,5 ml

Preparar con material estéril. Guardar a 4 °C.

- **SSC 20X (NaCl 3M, Citrato de Sodio 0,3 M (pH=7.0))**

NaCl	175,3 g
Citrato de sodio	88,2 g

Disolver por agitación en agua bidestilada. Ajustar el pH a 7,0 y completar el volumen hasta 1 l con agua bidestilada. Esterilizar a 121 °C durante 20 minutos. Guardar a temperatura ambiente.

- **SSC 5X, SDS 0,1% (p/v)**

20X SCC	125 ml
SDS 10% (p/v)	5 ml
Agua bidestilada estéril	370 ml

Preparar estéril y guardar a temperatura ambiente.

- **SSC 2X, SDS 0,1% (p/v)**

20X SCC	50 ml
SDS 10% (p/v)	5 ml
Agua bidestilada estéril	445 ml

Preparar estéril y guardar a temperatura ambiente.

- **SSC 3X, SDS 0,1 % (p/v)**

20X SCC	75 ml
---------	-------

SDS 10% (p/v)	5 ml
Agua bidestilada estéril	420 ml

Preparar estéril y guardar a temperatura ambiente.

- **Tris- HCl 1M (pH= 9,6)**

Tris base	60,57 g
Agua bidestilada	500 ml

Ajustar el pH con HCl hasta alcanzar un pH de 9,6. Disolver por agitación y esterilizar a 121 °C durante 15 minutos. Guardar a temperatura ambiente.

- **Na-laurilsarcosina 10% (p/v)**

Na-laurilsarcosina	10 g
Agua bidestilada	100 ml

Disolver por agitación. Esterilizar por filtración (0,22 µm). Guardar a temperatura ambiente.

### **Inmunodetección colonial del antígeno O157**

- **TBS ("Tris Buffer Saline ") 5X**

Tris base	6,055 g
NaCl	40,9 g
Agua destilada	1000 ml

Disolver por agitación. Guardar a 4 °C.

- **TBS-1X**

TBS-5x	100 ml
Agua destilada	400 ml

Preparar inmediatamente antes de utilizarlo.

- **TBS-Tween 5X**

Tris base	6,055 g
NaCl	40,9 g
Tween 20	5 ml
Agua destilada	1000 ml

Disolver por agitación. Guardar a 4 °C.

- **TBS-Tween 1X**

TBS-Tween 5x	100 ml
Agua destilada	400 ml

Preparar inmediatamente antes de utilizarlo.

- **Solución de bloqueo**

BSA (albúmina sérica bovina) 3% (p/v) en TBS 1X

Preparar inmediatamente antes de utilizar. Disolver por agitación.

- **Tampón de revelado (Tris-HCl 100 mM (pH=9,5), NaCl 100 mM)**

Tris-HCl 1 M, pH=9,5	50 ml
NaCl 5M	10 ml
Agua bidestilada estéril	440 ml

Preparar con material estéril. Guardar a 4 °C.

### **Electroforesis de lipopolisacárido (LPS) en geles de acrilamida**

- **Acrilamida-bisacrilamida (30% T, 2,67% C)**

Acrilamida	29,2 g
N' N'-Bis-metilen-acrilamida	0,8 g

Disolver y enrasar a 100 ml con agua bidestilada (~70 ml). Filtrar y guardar a 4 °C, protegido de la luz (30 días como máximo).



- **Tampón de electrotransferencia 10X**

Tris base	30 g
Glicina	144 g
Agua bidestilada	800 ml

Disolver por agitación. Acabar de enrasar con agua bidestilada hasta 1000 ml. El pH tiene que quedar entre 8,1 y 8,4. No ajustarlo. Guardar a 4 °C. Añadir metanol al 20% en el momento de preparar la solución de trabajo (1X).

- **Tampón de electrotransferencia 1X: Tris 25 mM, Glicina 192 mM, Metanol 20%**

Tampón de electrotransferencia 10X	100 ml
Metanol	200ml
Agua bidestilada	700 ml

El pH tiene que quedar entre 8,1 y 8,4. No ajustarlo. Mantener a 4 °C hasta el momento de su utilización.

- **SDS ("Sodium Dodecil Sulfate") al 10%**

SDS	10 g
Agua bidestilada	100 ml

Esterilizar 20 minutos a 121 °C y guardar a temperatura ambiente.

- **Tampón de compactación ("stacking buffer"): Tris-HCl 0,5 M (pH= 6,8)**

Tris base	6,05 g
Agua bidestilada	80 ml

Disolver por agitación y ajustar el pH a 6,8 con HCl. Acabar de enrasar con agua bidestilada hasta 100 ml. Guardar a 4 °C.

- **Tampón de resolución ("resolving buffer"): Tris-HCl 1,5 M (pH=8,8)**

Tris base	18,16 g
Agua bidestilada	80 ml

Disolver por agitación y ajustar el pH a 8,8 con HCl. Acabar de enrasar con agua bidestilada hasta 100 ml. Guardar a 4 °C.

- **APS ("Ammonium Persulfate") al 10%**

Persulfato amónico	1 g
Agua bidestilada	10 ml

Preparar al momento o guardar en alícuotas a -20 °C.

- **Tampón de recorrido para condiciones desnaturizantes 10X**

Tris base	30 g
Glicina	144 g
SDS	10 g
Agua bidestilada	800 ml

Disolver por agitación. Acabar de enrasar con agua bidestilada hasta 1000 ml. El pH tiene que quedar entre 8 y 9,1. No ajustarlo. Guardar a 4 °C.

- **Tampón de recorrido para condiciones desnaturizantes 1X: Tris 25 mM, Glicina 192 mM, SDS 0,1%**

Tampón de recorrido 10 X	100 ml
Agua bidestilada	900 ml

El pH tiene que quedar entre 8 y 9,1. No ajustarlo. Guardar a 4 °C.

- **TBS-Tween 5X**

Tris base	6,055 g
NaCl	40,9 g
Tween 20	5 ml
Agua destilada	1000 ml

Disolver por agitación. Guardar a 4 °C.

- **TBS-Tween 1X**

TBS-Tween 5X	100 ml
Agua destilada	400 ml

Preparar inmediatamente antes de utilizarlo.

**Extracción de ADN de bacteriófagos**

- **Mitomicina C (0,5 mg/ml)**

Mitomicina C	2 mg
Agua bidestilada	4 ml

Alicuotar y conservar a -20 °C. Manipular siempre con guantes.  
Producto potencialmente cancerígeno.

- **ADNsa I**

ADNsa I	100 mg
NaCl 150 mM	10 ml

Alicuotar y conservar a -20 °C.

- **ARNasa A**

ARNasa A	100 mg
Acetato de sodio 50 mM (pH= 5,0)	10 ml

Alicuotar y conservar a -20 °C.

- **Tampón SM**

NaCl	5,8 g
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	2 g
Tris-HCl 1 M pH= 7,5	50 ml
Gelatina	0,1 g
Agua bidestilada	950 ml

Esterilizar 20 minutos a 121 °C. Conservar a temperatura ambiente.

- **Tampón Proteinasa K (2X)**

Tris-HCl 1 M pH= 8,0	20 ml
EDTA 0,5 M pH=8,0	20 ml
SDS 10%	100 ml
Agua bidestilada	860 ml

Esterilizar 20 minutos a 121 °C. Conservar a temperatura ambiente.

- **Proteinasa K (20 mg/ml)**

Proteinasa K	100 mg
Agua bidestilada estéril	5 ml

Alicuotar y conservar a -20 °C.

- **CaCl<sub>2</sub> 0,1 M**

CaCl <sub>2</sub>	1,08 g
Agua destilada	100 ml

Disolver por agitación y calor. Dejar enfriar y esterilizarlo mediante filtros de 0,22 µm. Conservar en la oscuridad a 4 °C no más de 6 meses.

- **Acetato de sodio 3 M, pH= 7,2**

Acetato de sodio	82,03 g
Agua bidestilada	1l

Ajustar el pH a 7,2. Esterilizar 20 minutos a 121 °C. Conservar a temperatura ambiente.

### **Observación de fagos mediante el microscopio electrónico**

- **Ácido fosfotúngstico 2% KOH, pH =7,2**

Ácido fosfotúngstico	2 g
Solución KOH (0,1 M)	100 ml

Ajustar el pH a 7,2 con KOH 1M. Disolver por agitación y esterilizar por filtración.

### **Extracción de ADN cromosómico**

- **Tampón 1**

Tris-HCl	50 mM (pH= 8,0)
EDTA	50 mM

Ajustar el pH a 8,0. Esterilizar 20 minutos a 121 °C. Conservar a temperatura ambiente.

- **Tampón de lisis**

Tris-HCl	0,25 M (pH= 8,0)
----------	------------------

Ajustar el pH a 8,0. Esterilizar 20 minutos a 121 °C. Conservar a temperatura ambiente.

Añadir lisozima (10 mg/ml) inmediatamente antes de su utilización.

- **Tampón stop**

SDS	0,5%
Tris-HCl	50 mM (pH=7,5)
EDTA	0,4 M

Ajustar el pH a 7,5. Esterilizar 20 minutos a 121 °C. Conservar a temperatura ambiente.

Añadir Proteinasa K (1 mg/ml) inmediatamente antes de su utilización

- **Acetato de sodio 3 M (pH= 5,2)**

Acetato de sodio	82,03 g
Agua bidestilada	1l

Ajustar el pH a 5,2. Esterilizar 20 minutos a 121 °C. Conservar a temperatura ambiente.

### 1.3. Métodos generales

#### A) Extracción de ADN bacteriano mediante la matriz InstaGene (Bio-Rad, Richmond, USA)

- 1) Transferir 1 ml de un cultivo de 18-24 h de la correspondiente bacteria a un microtubo estéril.
- 2) Centrifugar 3 min a 16000 x *g* para obtener el precipitado bacteriano.
- 3) Descartar el sobrenadante y resuspender el precipitado en 200 µl de agua bidestilada estéril.
- 4) Repetir el paso 2.
- 5) Añadir 200 µl de la matriz InstaGene, con cuidado de no dañar la matriz y agitar con un agitador orbital durante 10 s.
- 6) Incubar a 55 °C durante 15 min.
- 7) Incubar a 100 °C durante 8 min.
- 8) Agitar 10 s con un agitador orbital.
- 9) Centrifugar durante 3 min a 16000 x *g* y transferir el sobrenadante a un nuevo microtubo estéril.
- 10) Conservar a -20 °C hasta su utilización.

#### B) Electroforesis de LPS en geles de acrilamida

##### 1. Extracción del lipopolisacárido (LPS)

- 1) Preparar un cultivo de 18-24 h en TSB en agitación, a 37 °C.
- 2) Ajustar la suspensión al 40% de transmitancia (DO<sub>525</sub>) con PBS.
- 3) Centrifugar 1,5 ml del cultivo a 16000 x *g*.
- 4) Resuspender las células en 50 µl de LSB.
- 5) Incubar a 100 °C durante 10 min.
- 6) Añadir 10 µl de una solución de proteinasa K (2,5 mg/ml LSB)

- 7) Incubar a 60 °C durante 1 h.
- 8) Cargar 10 µl de la muestra en el gel de poliacrilamida para su análisis. (Las muestras pueden también guardarse a -20 °C hasta su uso. En este caso, dejar descongelar las muestras y calentarlas a 100 °C durante 10 minutos antes de cargarlas en el gel).

## **2. Análisis electroforético del extracto de LPS**

Montar los geles en un equipo Bio-Rad, Mini Protean II Dual Slab Cell de acuerdo con las instrucciones del fabricante y someterlos a un voltaje de 150 V durante 1 hora. A continuación teñirlos con nitrato de plata o transferidos a membranas de nitrocelulosa para realizar el análisis inmunológico.

### **2.1. Tinción de nitrato de plata**

- 1) Fijar el gel en 30% de etanol absoluto y 10% de ácido acético glacial en agua bidestilada, durante toda la noche, en agitación.
- 2) Oxidar con 0,7% de ácido peryódico en la misma solución de fijación preparada de nuevo durante 10 min.
- 3) Realizar 3 lavados de 15 min. con agua bidestilada.
- 4) Incubar con 0,1% de nitrato de plata en agua bidestilada durante 30 min.
- 5) Lavar brevemente con agua bidestilada.
- 6) Revelar con Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 3% y 54 µl de formaldehído al 37% en 100 ml de agua bidestilada, realizando varios cambios.
- 7) Parar el revelado con ácido acético al 1% durante 5 min.
- 8) Lavar con agua bidestilada durante 10 min realizando varios cambios.

### **2.2. Western blot**

Una vez realizada la electroforesis de los geles de acrilamida, transferirlos a membranas de nitrocelulosa para su detección inmunológica. Para ello, se utilizar un equipo Bio-Rad, Mini Protean II Dual

Slab Cell. Montar los geles en los soportes correspondientes de acuerdo con las instrucciones del fabricante y someterlos a una corriente de 100 V durante 1 h. Posteriormente, dejar secar la membrana de nitrocelulosa y realizar la detección inmunológica, tal como se indica en el apartado de Inmunodetección colonial.

### **C) Extracción de ADN de bacteriófagos portadores de la toxina *Stx*<sub>2</sub>**

- 1) Inocular 200 ml de medio LB 5 mM CaCl<sub>2</sub> (10 ml CaCl<sub>2</sub> 0,1 M) con la cepa portadora del gen *stx*<sub>2</sub>. Incubar a 37 °C en agitación a 180 rpm hasta que el cultivo alcance una DO<sub>600</sub> de 0,3.
- 2) Añadir mitomicina C a una concentración final de 0,5 µg/ml (200 µl mitomicina C 0,5 mg/ml). Incubar el cultivo a 37 °C y en agitación a 180 rpm durante 18 horas, protegiéndolo de la luz con papel de aluminio.
- 3) Centrifugar el cultivo durante 30 minutos a 9000 rpm, a 4 °C.
- 4) Filtrar el sobrenadante con filtros de 0.22µm de baja adsorción proteica (Millex-GP, Millipore, Bedford, Massachussets) y transferirlo a tubos estériles.
- 5) Añadir ADNsa I y RNasa A a una concentración final de 0,5 µg/ml (10µl de una solución a 10 mg/ml, 10 U/ml)) (Sigma Aldrich, Madrid, España). Incubar a 37 °C durante 45 minutos.
- 6) Añadir NaCl a una concentración final de 5,8% (p/v). Disolver invirtiendo el tubo cuidadosamente. Incubar 1 hora en hielo.
- 7) Centrifugar 10 minutos a 4 °C, a 9000 rpm.
- 8) Transferir el sobrenadante a nuevos tubos estériles. Añadir Polyethylenglycol 6000 a una concentración final del 10% (p/v). Disolver a temperatura ambiente. Incubar en hielo durante 1 hora.
- 9) Centrifugar 30 minutos a 4 °C, a 9000 rpm. Eliminar el sobrenadante. (El precipitado obtenido se puede conservar a -20 °C).
- 10) Resuspender cuidadosamente el precipitado en 1 ml de tampón SM.
- 11) Añadir 1 ml del tampón Proteinasa K y 12 µl de Proteinasa K (20 mg/ml). Incubar a 56 °C durante 1 hora.

- 12) Distribuir la solución en 4 microtubos y añadir el mismo volumen de Fenol/Cloroformo 1:1 a cada microtubo. Mezclar y centrifugar a temperatura ambiente a 14000 rpm. Transferir la fase acuosa superior a tubos nuevos y repetir la misma operación 3 veces.
- 13) Después de la última centrifugación, transferir la fase superior de los cuatro tubos (aproximadamente 1,5-2 ml) a un tubo de 10 ml y añadir 1/10 volúmenes de Acetato de sodio 3 M pH=7,2. Mezclar y añadir el doble del volumen de Etanol absoluto. Mezclar e incubar 30 minutos a temperatura ambiente.
- 14) Si se observa la formación de un precipitado, transferirlo mediante una pipeta Pasteur a un microtubo, realizar un lavado con 1 ml de Etanol 70% y centrifugar 2 minutos a 4 °C a 12000 rpm. Si no se forma el precipitado, distribuir la solución en 4 microtubos y centrifugar 10 minutos a 4 °C a 13000 rpm. Descartar el sobrenadante con una micropipeta y realizar un lavado con 1 ml de Etanol 70%. Centrifugar 2 minutos a 4 °C a 12000 rpm.
- 15) Eliminar el etanol y dejar secar el precipitado obtenido. Resuspender el precipitado en 50-100 µl de agua bidestilada estéril.

#### **D) Transducción de fagos (variación de Muniesa *et al.*, 2000)**

- 1) Preparar un cultivo de 18 a 24 h de las cepas que presentan el fago integrado en su cromosoma.
- 2) Añadir 1 ml de este cultivo en 10 ml de LB e incubar a 37 °C hasta que el cultivo alcance una  $DO_{600\text{ nm}} = 0,3$ .
- 3) Añadir mitomicina C, a una concentración final de 0,5 µg/ml. Incubar a 37 °C entre 18-24 h en oscuridad y agitación a 180 rpm.
- 4) Centrifugar el cultivo a 10000 rpm durante 15 min y recuperar el sobrenadante.
- 5) Filtrar el sobrenadante mediante filtros de poliéter sulfona, de 0,22 µm de diámetro de poro.
- 6) Incubar a 37 °C durante 30 min y sin agitación la siguiente mezcla:

0,1 ml de la correspondiente dilución del bacteriófago (Directa,  $10^{-1}, 10^{-2}$ )

0,1 ml de  $\text{CaCl}_2$  0,1 M

0,4 ml de la cepa *E.coli* DH5 $\alpha$  ( $\text{DO}_{600\text{nm}} = 0,2$ )

- 7) Añadir a la mezcla 2,5 ml de agar LB semisólido, agitar y verter sobre una placa de agar LB.
- 8) Incubar las placas a 37 °C durante 18-24h.
- 9) Recuperar el agar semisólido con una asa de Digralsky y verterlo en un tubo de 50 ml.
- 10) Resuspender el agar semisólido en 1 ml de tampón SM y agitarlo durante 1 min.
- 11) Centrifugar durante 6000xg durante 10min y recoger el sobrenadante en un microtubo.
- 12) Incubar a 37 °C durante 1h.
- 13) Realizar diluciones decimales (hasta la  $10^{-7}$ ) y sembrar 0,1ml de cada dilución en placas de LB.
- 14) Incubar a 37 °C durante 18-24 h.
- 15) Comprobar la presencia del gen en las colonias que hayan crecido mediante la hibridación colonial descrita anteriormente.
- 16) Realizar un aislamiento de las colonias positivas para la hibridación y confirmar la presencia del gen mediante la PCR descrita en el apartado 1.2.4.2 del Capítulo 1.
- 17) De las colonias positivas, para confirmar la estabilidad de los bacteriófagos integrados, realizar dos pases en agar LB por estría en escocés y a continuación realizar una PCR del gen que codifica la subunidad A del la Stx<sub>2</sub>.

## **E) Secuenciación de los amplímeros obtenidos**

### **1. Purificación del ADN**

Purificar el ADN amplificado en la reacción de PCR mediante un Kit comercial de purificación de PCR (Qiagen Inc., Valencia, California, Estados Unidos). También puede utilizarse un Kit de extracción de ADN del gel de agarosa (Qiagen Inc., Valencia, California, Estados Unidos).

### **2. Reacción de secuenciación**

Utilizar el Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems, USA) y el ABI PRISM 3700 DNA Sequencer (Applied Biosystems, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

La mezcla de reacción debe consistir en lo siguiente:

Cebador (1 $\mu$ M)	1,6 $\mu$ l
Big Dye	3 $\mu$ l
ADN	1 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O d	4,5 $\mu$ l

### **3. Eliminación de ddNTPs marcados no incorporados durante la reacción de secuenciación**

- 1) Añadir a un tubo de 1,5 ml: 62,5  $\mu$ l de Etanol 96% y 17,5  $\mu$ l de agua bidestilada.
- 2) Añadir la reacción de secuenciación (completar previamente el volumen final de la reacción a 20  $\mu$ l con agua bidestilada).
- 3) Precipitar durante 15 min a temperatura ambiente.
- 4) Centrifugar 20 min a 14000 rpm, a temperatura ambiente.
- 5) Eliminar la solución de etanol.
- 6) Añadir 200  $\mu$ l de etanol 70%.
- 7) Centrifugar 5 min a 14000 rpm, a temperatura ambiente.

- 8) Eliminar la solución de etanol al máximo y dejar secar el precipitado. Se puede conservar a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 1 año.

#### **F) Extracción de ADN cromosómico**

- 1) Preparar un cultivo de 18-24 h de 40 ml a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  y en agitación a 180 rpm.
- 2) Centrifugar a 5000 rpm a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , durante 15 min.
- 3) Descartar el sobrenadante y resuspender el precipitado bacteriano en 5 ml del tampón 1 (50 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, pH= 8,0)
- 4) Incubar durante 1 h. (incluso durante toda la noche) a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
- 5) Añadir 0,5 ml de tampón de lisis (lisozima 10 mg/ml en Tris-HCl 0,25 M, pH= 8,0) a las células congeladas.
- 6) Agitar por inversión e incubar 45 min en hielo.
- 7) Añadir 1 ml del tampón stop ( 0,5% SDS, 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,4 M EDTA y 1 mg/ml Proteinasa K) y agitar por inversión.
- 8) Incubar durante 1 h. a  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
- 9) Añadir 15  $\mu\text{l}$  de RNAsa e incubar 10 min. a temperatura ambiente. Ajustar hasta 10 ml con agua bidestilada (no agitar)
- 10) Añadir 6 ml de fenol (Tris-HCl, pH= 8,0) y mezclar con un agitador orbital.
- 11) Centrifugar durante 15 min a 10000 rpm a temperatura ambiente.
- 12) Recoger la fase acuosa lentamente en un tubo de vidrio.
- 13) Añadir 0, 1 volúmenes de Acetato de sodio 3 M (pH= 5,2). Mezclar.
- 14) Añadir 2,5 volúmenes de Etanol absoluto a temperatura ambiente y mezclar cuidadosamente.
- 15) Mantener estático hasta al formación de un precipitado blanco (plumoso).
- 16) Realizar un lavado con etanol absoluto y otro con etanol al 70%.
- 17) Resuspender en aproximadamente 500-700  $\mu\text{l}$  de agua destilada estéril y guardar a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .



- 7) Recortar los marcadores
- 8) Fijar con luz UV (4 min por la cara del ADN y 2 min por el reverso)
- 9) Proceder con la hibridación de la membrana tal como se ha descrito anteriormente o conservar a 4 °C hasta su utilización.

### **I) "Dot blot"**

- 1) Equilibrar una membrana de nylon Hybond-N (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, Inglaterra), sumergiéndola en SSC 6X.
- 2) Depositar una gota de 15 µl de la solución conteniendo el ADN amplificado que se pretende estudiar sobre la membrana. Dejar secar a temperatura ambiente entre 15 -20 min.
- 3) Fijar el ADN a la membrana mediante la exposición a la luz UV (4 min por la cara del ADN y 2 min por el reverso).
- 4) Proceder con la hibridación de la membrana o conservar a 4 °C hasta su utilización.

### **J) Marcaje de ADN con digoxigenina**

#### **1. Marcaje mediante PCR**

Las sondas utilizadas en la hibridación colonial de 169 pb y 378 pb fueron sintetizadas y marcadas con digoxigenina mediante PCR. La reacción de PCR fue la misma que la descrita en el apartado 1.2.4.2. del Capítulo 2. La mezcla de reacción consistió en lo siguiente:

H <sub>2</sub> O d	33,1 µl
Cebador 1 (0,3 µM)	1 µl
Cebador 2 (0,3 µM)	1 µl
Mezcla de nucleótidos (10 mM dATP, 10 mM dGTP, 10 mM dCTP y 7 mM dTTP)	1 µl
Dioxigenin-11-dUTP (1mM)	3,5 µl
Tampón PCR (10X)	5 µl
MgCl <sub>2</sub> (2 mM)	1µl
Taq	0,4 µl

ADN

4  $\mu$ l

## **2. Marcaje mediante el enzima Klenow**

El marcador de peso molecular de ADN lambda fue marcado con digoxigenina mediante el enzima Kenow (Roche Diagnostics), para su detección mediante "Southern Blot" utilizando la siguiente mezcla de reacción:

Preparar 15  $\mu$ l de ADN en cadena sencilla (10 ng -3  $\mu$ g)  
(incubarlo 10 min a 100 °C y colocarlo  
inmediatamente en hielo).

A continuación, añadir:

2  $\mu$ l de la mezcla de hexanucleótidos

2  $\mu$ l de la mezcla DIG/dNTP

1  $\mu$ l de enzima Klenow

## **K) Detección de la sonda marcada con digoxigenina**

Para la detección de la señal de hibridación positiva utilizar un Kit comercial de detección de digoxigenina (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). Este Kit se basa en la detección de la molécula de digoxigenina mediante anticuerpos conjugados con el enzima fosfatasa alcalina, que son capaces de unirse a la molécula de digoxigenina y producir una determinada reacción enzimática (colorimétrica o luminiscente) en función del substrato utilizado. Para ello, seguir el siguiente protocolo:

- 1) Equilibrar la membrana en el tampón de lavado a temperatura ambiente durante 5 min en agitación.
- 2) A continuación, incubar la membrana en el tampón 2 a temperatura ambiente durante 30 min en agitación.
- 3) Cambiar la solución anterior por solución de tampón 2 nueva con anticuerpo (1:10000 en tampón 2). Incubar la membrana durante 30 min a temperatura ambiente en agitación.

- 4) Realizar dos lavados de 15 min con tampón de lavado a temperatura ambiente y en agitación.
- 5) Equilibrar la membrana en tampón 3 durante 5 min a temperatura ambiente y en agitación.
- 6) Incubar la membrana en una dilución de substrato luminiscente CSPD 1:100 en tampón 3 durante 5 min a temperatura ambiente.\*
- 7) Eliminar el exceso de líquido de la membrana, pero sin dejar que la membrana se seque y colocar la membrana en una bolsa de plástico sellada.
- 8) Incubar la membrana durante 10 min a 37 °C.
- 9) Exponer la membrana al film Polaroid durante 60 min ó más, hasta que se observe la señal en el revelado.
- 10) Revelar el film fotográfico con soluciones de revelado fotográfico y fijación comunes (2 min solución de revelado, 2 min lavado con agua destilada, 2 min solución fijadora y 2 min lavado con agua destilada, realizando todos los pasos a temperatura ambiente, en agitación y en oscuridad absoluta).

\* Alternativamente, se puede utilizar el substrato cromogénico NBT/BCIP diluido en el tampón 3 (2/100), en lugar del substrato luminiscente. En este caso, incubar la muestra a temperatura ambiente, en oscuridad y en estático, hasta la aparición de un precipitado de color azul, que indica hibridación positiva de la muestra.

## **L) Aislamiento de *E. coli* O157**

### **1. Enriquecimiento de la muestra**

Incubar 50 ml de la muestra en 100 ml de agua peptonada suplementada con vancomicina (8 mg/l) y cefsulodina (10 mg/l) durante 1 h 30 min a 37 °C en agitación a 180 rpm.

### **2. Separación inmunomagnética y siembra en agar CT-SMAC**

El protocolo de inmunoseparación (IMS) con microesferas Dynabeads utilizado para separar *E. coli* O157 es el siguiente:

- 1) Sacar el imán del soporte (Dynal MPC-M) y colocar los tubos estériles de 10 ml dentro del soporte.
- 2) Añadir 9 ml de PBS-Tween, 1 ml de la muestra enriquecida y 20  $\mu$ l de la suspensión de Dynabeads anti-*E. coli* O157 en cada tubo. Normalmente, el método indicado por el fabricante se realiza directamente con 1 ml de muestra cuando ésta no presenta excesivo material particulado o celular ya que éste se une inespecíficamente a las microesferas. Las aguas residuales presentan mucho material particulado, y para evitar la unión inespecífica de este material se diluyó 1 ml de la muestra en 9 ml de PBS-Tween siguiendo los consejos del fabricante.
- 3) Agitar los tubos colocados en el soporte Dynal MPC-M durante 4 min a temperatura ambiente. Agitar por inversión el soporte MPC-M con los tubos para asegurar una buena homogenización.
- 4) Colocar el imán en el soporte MPC-M y a continuación invertir el MPC-M varias veces durante 3 min para homogeneizar bien la muestra con los Dynabeads. En este momento las microesferas unidas a las células *E. coli* O157 quedan retenidas a la pared del microtubo donde se aplica el imán.
- 5) Abrir los microtubos y utilizando una pipeta separar el sobrenadante por aspiración. Las microesferas paramagnéticas complementadas con las células *E. coli* O157 quedan atrapadas a la pared debido al campo magnético generado. A continuación, realizar un lavado con 9 ml de PBS-Tween, siguiendo el mismo proceso.
- 6) Sacar el imán del soporte Dynal- MPC.
- 7) Añadir 1 ml de tampón PBS-Tween a cada tubo, cerrar los tubos e invertir el soporte MPC unas cuantas veces para resuspender el complejo de Dynabeads y *E. coli* O157.
- 8) Repetir los puntos 4-6. Esta repetición permite separar más las células del material particulado presente en la muestra.
- 9) Repetir los puntos 7-8, por el mismo motivo.

- 10) Resuspender el complejo de Dynabeads- *E. coli* O157 en 100 µl de tampón PBS-Tween. Agitar el microtubo para homogeneizar la muestra.
- 11) Sembrar los 100 µl en agar CT-SMAC para hacer un recuento de las presuntas *E. coli* O157. Incubar a 37 °C durante 24 h.

### **3. Inmunodetección colonial del antígeno O157**

- 1) Transferir las colonias de las placas de agar CT-SMAC a membranas de nitrocelulosa (Hybond ECL, Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, Inglaterra).
- 2) Fijar las colonias sobre papel Whatman 1MM saturado con solución TBS 1X durante 5 minutos.
- 3) Secar la membrana a 37 °C durante 30 minutos.
- 4) Incubar la membrana en TBS 1X, 3% BSA (albúmina sérica bovina) a temperatura ambiente y en agitación durante 1 hora y 15 minutos.
- 5) Realizar un lavado con TBS 1X, 1% BSA a temperatura ambiente y en agitación durante 10 minutos.
- 6) Incubar con anticuerpo Anti-O157 1:1000 en TBS 1X, 1% BSA a temperatura ambiente y en agitación durante 1 hora y 30 minutos.
- 7) Realizar tres lavados de 5 minutos con TBS-Tween 1X a temperatura ambiente y agitación.
- 8) Incubar con el anticuerpo conjugado con fosfatasa alcalina (anti-rabbit IgG), 1:1000 en TBS 1X, 1% BSA a temperatura ambiente y en agitación durante 1 hora y 30 minutos.
- 9) Repetir el paso 7.
- 10) Incubar en el tampón 3 de revelado durante 5 minutos a temperatura ambiente y agitación.
- 11) Incubar con el sustrato NBT/BCIP 1:50 en el tampón 3 de revelado a oscuras y en estático hasta que se produzca la reacción.
- 12) Parar la reacción con agua bidestilada.

#### **4. Confirmación de *E. coli* O157 mediante el kit comercial Singlepath® (Merck, Darmstadt, Alemania)**

- 1) Colocar los tests en una superficie plana.
- 2) Colocar 150 µl de un cultivo en TSB *over night* de la cepa correspondiente en el orificio redondo del dispositivo en ensayo.
- 3) Evaluar al cabo de 20 minutos.
- 4) La aparición de una banda de color rojo debe considerarse como reacción positiva

#### **M) Detección de la producción de proteína *Stx*<sub>1</sub> y *Stx*<sub>2</sub> mediante la utilización del kit comercial Duopath® Verotoxina (Merck, Darmstadt, Alemania)**

- 1) A partir de un cultivo reciente, realizar un cultivo de la cepa correspondiente en caldo CAYE modificado según Evans (Merck, Darmstadt, Alemania). Incubar durante 6 h a 37 °C sin agitación.
- 2) Pasar 180 µl del cultivo CAYE a un microtubo.
- 3) Añadir 20 µl de solución de polimixina (5 mg/ml).
- 4) Incubar la mezcla durante 10 min a 37 °C.
- 5) Dejar enfriar a temperatura ambiente.
- 6) Colocar el test en una superficie plana y añadir aproximadamente 150 µl de la muestra.
- 7) Evaluar al cabo de 20 min.
- 8) El test funciona correctamente si aparece una línea de color rojo en la zona de control (C). La aparición de una línea de color rojo en alguna de las zonas de ensayo (VT1 y/o VT2) se considera una reacción positiva.

#### **N) Tinción negativa para la observación de los bacteriófagos al MET**

Depositar 10 µl de la suspensión fágica correspondiente sobre una rejilla de cobre para microscopía electrónica de 200 nm, cubiertas con una

película de Formvar recubierta de carbono. Dejar que se adsorba durante 2 min. A continuación, retirar el exceso de suspensión con papel de filtro y se añadir una gota de ácido fosfotúngstico 2% KOH, pH 7,2 (Anexo III) e incubar durante 2,5 min. Posteriormente, retirar el exceso de la solución de ácido fosfotúngstico mediante papel de filtro y dejar secar a temperatura ambiente. Las muestras pueden ser observadas a continuación, aunque permanecen estables durante algunas semanas.



## ANEXO IV

---

*"Serotipos de cepas STEC descritos en la actualidad"*



## Detección de serotipos STEC en diferentes tipos de muestras

Serotipo O:H	Origen							
	Al	Av	B	C	H	O	P	V
O1:H <sup>-</sup>		X			X			
O1:H1					X			
O1:H2			X					
O1:H4		X						
O1:H7		X			X			
O1:H18			X					
O1:H20	X		X		X			
O2:H <sup>-</sup>		X	X					
O2:H1		X			X			
O2:H4		X	X					
O2:H5		X	X		X			
O2:H6			X		X			
O2:H7		X	X		X			
O2:H8			X					
O2:H21			X					
O2:H25			X					
O2:H26			X					
O2:H27	X		X		X			
O2:H29			X		X		X	
O2:H32	X							
O2:H39			X					
O2:H45			X					
O2:HNT						X		
O3:H <sup>-</sup>			X		X			
O3:H2	X				X			
O3:H7			X					
O3:H10					X			
O3:H12			X					
O3:H21					X			
O4:H <sup>-</sup>			X		X	X		
O4:H4			X					
O4:H5					X			
O4:H10					X	X		
O4:H21			X					
O4:H25			X					
O4:H40					X			
O4:H44			X					
O5:H-	X		X		X	X		
O5:H7			X					
O5:H10				X				
O5:H11			X					
O5:H27			X					
O5:H28						X		
O5:HNT						X		
O6:H-			X		X	X		
O6:H1								X
O6:H2					X	X		
O6:H3			X					
O6:H4					X			
O6:H7							X	
O6:H10			X			X		
O6:H12						X		
O6:H28					X	X		
O6:H34	X		X				X	
O6:H49			X			X		
O6:HNT			X		X			
O7:H4			X		X			
O7:H6			X					
O7:H7		X						
O7:H8					X			
O7:H21								X
O7:H31								X

Serotipo O:H	Origen								
	Al	Av	B	C	H	O	P	V	
O8:H <sup>-</sup>	X	X			X		X		
O8:H2			X		X		X		
O8:H4			X						
O8:H5			X						
O8:H8			X						
O8:H9	X		X		X	X	X		
O8:H11							X		
O8:H14					X				
O8:H16			X						
O8:H19	X		X		X		X		
O8:H21	X				X				
O8:H25			X		X				
O8:H30			X			X			
O8:H35			X						
O8:HNT	X		X		X				
O9:H <sup>-</sup>					X	X	X		
O9:H21					X				
O10:H <sup>-</sup>			X						
O11:H2					X				
O11:H8			X						
O11:H14			X						
O12:H <sup>-</sup>					X				
O14:H <sup>-</sup>					X				
O15:H <sup>-</sup>	X		X		X	X			
O15:H8			X		X				
O15:H11			X						
O15:H16			X						
O15:H21		X							
O15:H27	X		X		X				
O15:H45	X								
O15:HNT						X		X	
O16:H <sup>-</sup>					X				
O16:H2			X						
O16:H21			X						
O16:H32					X				

Serotipo O:H	Origen								
	Al	Av	B	C	H	O	P	V	
O16:H48					X				
O17:H <sup>-</sup>									X
O17:H16		X							
O17:H18	X		X						
O18:H <sup>-</sup>					X		X	X	
O18:H11			X						
O18:H12					X				
O18:H15					X				
O18:H17		X							
O18:HNT					X				
O20:H <sup>-</sup>					X		X		
O20:H7					X				
O20:H16			X						
O20:H19			X		X	X			
O20:H44			X						
O20:HNT			X						
O21:H <sup>-</sup>					X				
O21:H14									X
O21:H21	X		X						X
O21:H22									X
O21:H31									X
O22:H <sup>-</sup>			X						
O22:H1					X				
O22:H2			X						
O22:H5					X				
O22:H7			X						
O22:H8	X		X		X				
O22:H16	X		X		X				
O22:H21			X						
O22:H40			X						
O22:H54	X								
O23:H <sup>-</sup>					X				
O23:H7					X				
O23:H15	X		X						
O23:H16					X				

Serotipo O:H	Origen							
	Al	Av	B	C	H	O	P	V
O23:H19					X			
O25:H <sup>-</sup>					X			
O25:H2					X			
O25:H7								X
O25:H11		X						
O25:H14					X			
O25:H21	X							
O25:HNT					X			
O26:H <sup>-</sup>			X		X			
O26:H2			X		X			
O26:H11	X		X		X	X		
O26:H12					X			
O26:H21			X		X			
O26:H32			X					
O26:HNT			X		X			
O27:H30					X			
O28:H <sup>-</sup>			X		X			
O28:H4	X							
O28:H8			X					
O28:H35					X			
O28:H40			X					
O29:H34			X					
O30:H2	X							
O30:H12						X		
O30:HNT					X			
O31:H <sup>-</sup>					X			
O32:H45					X			
O35:H1							X	
O35:H7						X		
O35:H21			X					
O35:H34		X						
O35:HNT					X			
O36:H <sup>-</sup>			X				X	
O36:H48			X		X			
O38:H16			X					

Serotipo O:H	Origen							
	Al	Av	B	C	H	O	P	V
O38:H21			X		X			
O38:HNT			X					
O39:H <sup>-</sup>			X					
O39:H7			X					
O39:H8			X		X			
O39:H21			X					
O39:H48			X					
O39:H49	X		X					
O40:H <sup>-</sup>					X			
O40:H6					X			
O40:H8	X		X		X			
O40:H21			X					
O41:H14	X							
O42:H25			X					
O42:HNT						X		
O43:H2	X		X		X			
O45:H <sup>-</sup>	X	X	X		X			X
O45:H2			X		X			
O45:H6			X					
O45:H8			X					
O45:H12			X					
O46:H <sup>-</sup>			X					
O46:H2			X		X			
O46:H31		X			X			
O46:H38	X		X					
O46:HNT			X					
O48:H21					X			
O49:H <sup>-</sup>			X		X	X		
O50:H <sup>-</sup>					X			
O50:H7					X			
O51:H <sup>-</sup>			X					
O51:H42							X	
O52:H12						X		
O52:H19					X			
O52:H25					X			

Serotipo O:H	Origen								
	Al	Av	B	C	H	O	P	V	
O52:H45						X			
O53:H2			X						
O54:H2	X								
O54:H21	X								
O55:H <sup>-</sup>					X	X			
O55:H2						X			
O55:H6					X				
O55:H7					X				
O55:H10		X			X				
O55:H17			X						
O55:HNT					X				
O56:H <sup>-</sup>	X								
O56:H24	X								
O56:H56	X								
O60:H <sup>-</sup>					X				
O60:H2					X				
O60:H19	X				X				
O62:H <sup>-</sup>					X				
O62:H30	X								
O64:H5	X								
O65:H <sup>-</sup>							X		
O65:H9							X		
O65:H14									X
O65:H16					X				
O65:H48	X								
O68:H <sup>-</sup>			X						
O68:H4					X				
O68:H14			X						
O69:H <sup>-</sup>			X		X				
O69:H8						X			
O69:H11			X						
O69:H28			X						
O70:H <sup>-</sup>					X				
O70:H8			X						
O70:H11	X		X						

Serotipo O:H	Origen								
	Al	Av	B	C	H	O	P	V	
O70:H35					X				
O71:H <sup>-</sup>					X				
O71:H12						X			
O71:HR	X								
O73:H34					X				
O73:HNT			X		X				
O74:H <sup>-</sup>			X	X	X				
O74:H19			X						
O74:H29			X						
O74:H42			X						
O74:H52			X						
O74:HNT			X						
O75:H <sup>-</sup>					X	X		X	
O75:H1			X						
O75:H5					X				
O75:H8	X				X	X			
O75:H9	X								
O75:H21					X				
O75:H33					X				
O75:H40	X						X		
O75:H55							X		
O75:HNT	X								
O76:H2			X						
O76:H7			X		X				
O76:H19			X		X				
O76:H21			X						
O76:H25			X						
O76:H32	X								
O76:HNT			X						
O76:HR						X			
O77:H <sup>-</sup>					X				
O77:H4					X	X			
O77:H7					X				
O77:H18			X		X				
O77:H39			X						

Serotipo O:H	Origen							
	Al	Av	B	C	H	O	P	V
O77:H41	X		X		X			
O78:H <sup>-</sup>		X			X			
O78:H4		X						
O78:H9		X						
O79:H <sup>-</sup>	X		X					
O79:H2			X					
O79:H7					X			
O79:H10						X		
O79:H14						X		
O80:H <sup>-</sup>			X		X			
O81:H <sup>-</sup>	X							
O81:H21			X					
O81:H26	X							
O81:H31			X		X			
O82:H <sup>-</sup>					X			
O82:H2			X		X			
O82:H8	X		X	X				
O82:H40			X					
O83:H1					X			
O83:H4		X						
O84:H <sup>-</sup>			X		X			
O84:H2			X					
O84:H6					X			
O84:H8			X					
O84:H28			X					
O84:H31						X		
O84:HNT			X		X			
O85:H <sup>-</sup>			X		X			
O86:H <sup>-</sup>	X	X			X			
O86:H4		X						
O86:H26			X					
O87:H2						X		
O87:H8			X					
O87:H16	X		X			X		
O87:H21				X				

Serotipo O:H	Origen							
	Al	Av	B	C	H	O	P	V
O87:H31			X					
O88:H <sup>-</sup>	X		X		X	X		
O88:H8	X							
O88:H21			X					
O88:H25	X		X		X			
O88:H49	X							
O89:H <sup>-</sup>					X			
O90:H <sup>-</sup>						X		
O90:H2	X							
O90:H21						X		
O90:H24			X			X		
O91:H <sup>-</sup>	X		X		X	X	X	
O91:H7			X					
O91:H8			X					
O91:H10			X		X			
O91:H14	X		X		X			
O91:H21	X		X		X	X		
O91:H29						X		
O91:H38							X	
O91:H40					X			
O91:H49	X		X					
O91:HNT					X			
O92:H <sup>-</sup>			X				X	
O92:H33					X			
O92:HNT					X			
O93:H <sup>-</sup>								X
O93:H19			X		X			
O95:H <sup>-</sup>					X			
O96:H <sup>-</sup>					X			X
O96:H19			X					
O98:H <sup>-</sup>			X		X			
O98:H7						X		
O98:H25			X					
O98:HNT					X			
O100:H <sup>-</sup>	X						X	

Serotipo O:H	Origen							
	Al	Av	B	C	H	O	P	V
O100:H25					X			
O100:H32					X			
O101:H <sup>-</sup>	X	X			X		X	
O101:H4	X							
O101:H7								X
O101:H9					X			
O101:H14							X	
O101:H39			X					
O102:H6					X			
O102:H7					X			
O102:H21			X					
O103:H <sup>-</sup>			X		X			
O103:H2	X		X		X			
O103:H6					X			
O103:H7	X							
O103:H12			X					
O103:H14	X							
O103:H18					X			
O103:H21					X			
O103:H25					X			
O103:H42			X					
O103:H43		X						
O103:HNT			X		X			
O104:H <sup>-</sup>	X				X			
O104:H2					X			
O104:H7	X		X		X	X		
O104:H11			X					
O104:H16					X			
O104:H21					X			
O105:H18	X		X		X			
O105ac:H18			X		X			
O106:H2						X		
O106:H20						X		
O106:H42			X					
O107:H11	X							

Serotipo O:H	Origen							
	Al	Av	B	C	H	O	P	V
O107:H27					X			
O108:H2			X					
O108:H7			X					
O109:H <sup>-</sup>			X					
O109:H16			X					
O110:H <sup>-</sup>						X		
O110:H2			X					
O110:H16	X							
O110:H19					X			
O110:H31	X							
O110:H40			X					
O111:H <sup>-</sup>	X		X		X			
O111:H2			X		X			
O111:H4		X						
O111:H7					X			
O111:H8			X		X			
O111:H11			X					
O111:H16			X					
O111:H21					X			
O111:H30					X			
O111:H45								X
O111:HNT			X		X			
O111ac:H <sup>-</sup>			X		X			
O111ac:H8					X			
O112:H <sup>-</sup>						X		
O112:H2	X		X					
O112:H7			X					
O112:H21	X				X			
O112ab:H2	X				X			
O112ab:H21					X			
O112ac:H <sup>-</sup>					X			
O112ac:H19			X		X			
O113:H <sup>-</sup>	X		X		X			
O113:H2			X					
O113:H4	X		X		X			

Serotipo O:H	Origen							
	Al	Av	B	C	H	O	P	V
O113:H5					X			
O113:H6					X			
O113:H7	X							
O113:H11			X					
O113:H18					X			
O113:H19			X					
O113:H21	X		X		X			
O113:H27			X					
O113:H32					X			
O113:H53					X			
O113:H <sup>-</sup>					X			
O113:HR					X			
O114:H <sup>-</sup>			X					
O114:H4	X				X			
O114:H21			X					
O115:H <sup>-</sup>	X	X			X			
O115:H7					X			
O115:H8			X					
O115:H10					X			
O115:H18	X		X		X			
O116:H <sup>-</sup>	X		X					X
O116:H10			X					
O116:H21	X		X		X			
O116:H25					X			
O116:H28			X					
O116:HNT			X					
O117:H <sup>-</sup>			X			X		
O117:H4	X		X					
O117:H7			X		X			
O117:H8	X							
O117:H19			X					
O117:H21						X		
O118:H <sup>-</sup>			X		X			
O118:H1					X			
O118:H2					X			

Serotipo O:H	Origen							
	Al	Av	B	C	H	O	P	V
O118:H12					X	X		
O118:H16			X		X			
O118:H30					X			
O118:HNT					X			
O119:H <sup>-</sup>	X		X		X	X		
O119:H2					X			
O119:H5					X			
O119:H6			X		X			
O119:H8			X					
O119:H16			X					
O119:H25	X		X		X	X		
O119:H40			X					
O119:HNT			X					
O120:H <sup>-</sup>					X	X	X	
O120:H2			X					
O120:H18			X					
O120:H42			X					
O120:HNT					X			
O121:H <sup>-</sup>					X			
O121:H7			X					
O121:H10	X				X		X	
O121:H11					X			
O121:H19			X		X			
O122:H <sup>-</sup>					X			
O123:H <sup>-</sup>					X	X		
O123:H10	X				X	X		
O123:HNT	X							
O124:H19			X					
O125:H <sup>-</sup>					X	X		
O125:H14						X		
O125:H26						X		
O125:H47			X					
O125ac:H <sup>-</sup>					X			
O126:H8			X			X		
O126:H20			X		X			

Serotipo O:H	Origen							
	Al	Av	B	C	H	O	P	V
O126:H21			X		X			
O126:H27			X		X			
O127:H21					X			
O127:HNT			X					
O128:H <sup>-</sup>	X		X		X	X		X
O128:H2	X		X		X	X		X
O128:H7					X			
O128:H8					X	X		
O128:H10					X	X		
O128:H12					X			
O128:H21						X		
O128:H35	X		X					
O128:H45					X			
O128:HNT			X		X			
O128ab:H <sup>-</sup>					X			
O128ab:H2	X				X			
O128ab:H8			X		X			
O128ab:H21			X					
O128ab:H45					X			
O129:H <sup>-</sup>					X			
O130:H11	X		X					
O130:H38			X					
O130:H43			X					
O131:H2			X					
O132:H <sup>-</sup>			X		X			
O132:H2			X					
O132:H18			X					
O133:H53					X			
O134:H <sup>-</sup>	X							
O134:H25					X			
O136:H <sup>-</sup>			X			X		
O136:H1			X					
O136:H12			X					
O136:H16			X					X
O136:H19			X					

Serotipo O:H	Origen							
	Al	Av	B	C	H	O	P	V
O136:H20						X		
O137:H41					X			
O138:H <sup>-</sup>	X						X	
O138:H2					X			
O138:H8	X							
O138:H14							X	
O139:H <sup>-</sup>							X	
O139:H1							X	
O139:H19	X		X					
O140:H32			X					
O141:H <sup>-</sup>			X				X	
O141:H4							X	
O141:H8			X		X			
O142:H <sup>-</sup>							X	
O142:H38	X							
O143:H <sup>-</sup>					X			
O145:H <sup>-</sup>			X		X			
O145:H8			X					
O145:H16			X		X			
O145:H25			X		X			
O145:H28	X		X		X			
O145:HNT					X			
O146:H <sup>-</sup>	X				X	X		
O146:H1			X					
O146:H5					X			
O146:H8			X		X	X		
O146:H21			X		X	X		
O146:H28	X				X			X
O146:HNT					X			
O147:H2		X						
O147:H11			X					
O147:H29			X					
O148:H28					X			
O149:H10							X	
O149:H12	X							

Serotipo O:H	Origen							
	Al	Av	B	C	H	O	P	V
O149:H19			X				X	
O149:H45			X					
O149:HNT			X					
O150:H <sup>-</sup>			X		X			
O150:H8			X					
O150:H10					X			
O151:H <sup>-</sup>					X			
O151:H12	X							
O152:H <sup>-</sup>			X					X
O152:H4					X			
O153:H <sup>-</sup>			X			X		X
O153:H2					X			
O153:H8	X		X					
O153:H9			X					
O153:H12			X					
O153:H19			X					
O153:H21			X					
O153:H25	X		X		X	X		
O153:H31			X					
O153:HNT			X					
O154:H <sup>-</sup>			X		X			
O156:H <sup>-</sup>			X			X		
O156:H1			X					
O156:H4			X					
O156:H7			X					
O156:H8			X					
O156:H11						X		
O156:H21			X					
O156:H25	X		X		X	X		
O156:H26						X		
O156:H27					X			
O156:H46			X					
O156:HNT			X					
O157:H <sup>-</sup>	X		X		X			
O157:H7	X		X	X	X	X	X	X

Serotipo O:H	Origen							
	Al	Av	B	C	H	O	P	V
O157:H8			X					
O159:H <sup>-</sup>							X	
O159:HNT			X					
O160:H10			X					
O162:H <sup>-</sup>					X			
O162:H6					X			
O162:H8					X			
O162:H27			X					
O163:H <sup>-</sup>	X		X		X		X	
O163:H2			X					
O163:H19	X		X			X	X	
O165:H <sup>-</sup>			X		X	X		
O165:H25			X		X			
O166:H <sup>-</sup>						X		
O166:H12					X			
O166:H15					X			
O166:H28					X	X		
O168:H <sup>-</sup>					X			
O168:H8	X		X					
O169:H <sup>-</sup>					X			
O169:HNT			X					
O170:H8			X					
O171:H2	X		X					
O171:H25	X							
O172:H <sup>-</sup>			X		X			
O172:H16	X							
O172:H21			X					
O173:H2					X			
O174:H <sup>-</sup>			X		X			
O174:H2			X		X			
O174:H8					X			
O174:H21	X		X		X			
O175:H16					X			
ONT:H <sup>-</sup>	X		X		X	X	X	X
ONT:H1					X			

Serotipo O:H	Origen							
	Al	Av	B	C	H	O	P	V
ONT:H2	X		X		X	X		X
ONT:H4			X		X	X		
ONT:H5			X					
ONT:H6					X			
ONT:H7	X		X		X			
ONT:H8	X		X		X	X		
ONT:H9	X							
ONT:H10			X		X	X		
ONT:H11	X		X		X			
ONT:H12			X		X			
ONT:H13			X					
ONT:H14	X		X		X	X		
ONT:H16	X		X		X	X		
ONT:H18	X		X		X			
ONT:H19	X		X		X			
ONT:H21	X		X		X	X		
ONT:H24			X					
ONT:H25	X		X		X			
ONT:H27			X					
ONT:H28	X		X		X			
ONT:H29	X		X			X		
ONT:H32			X					
ONT:H33			X		X			
ONT:H34	X		X					
ONT:H37			X					
ONT:H38			X					
ONT:H40			X					
ONT:H41			X		X			
ONT:H42			X				X	
ONT:H45			X					X
ONT:H47	X							
ONT:H49			X					
ONT:HNT	X		X		X	X		
ONT:HR			X					
OE11362:H <sup>-</sup>			X					

Serotipo O:H	Origen							
	Al	Av	B	C	H	O	P	V
OE11362:H11			X					
OE11362:H21			X					
OE2981:H <sup>-</sup>			X					
OE54071:H19			X					
OR:H <sup>-</sup>	X	X	X		X	X		X
OR:H2	X				X	X		
OR:H4	X		X		X			
OR:H5					X			
OR:H7	X				X			
OR:H8	X		X					
OR:H9					X			
OR:H10			X			X		
OR:H11					X			
OR:H12	X		X		X			
OR:H14	X							
OR:H16					X			
OR:H18			X		X			
OR:H19	X		X		X			
OR:H20					X			
OR:H21	X		X		X			
OR:H25			X		X			
OR:H27			X					
OR:H28								X
OR:H30								X
OR:H31			X					
OR:H32			X					
OR:H34			X					
OR:H38			X					
OR:H39			X					
OR:H42	X							
OR:H45								X
OR:H47	X							
OR:H49					X			
OR:HNT	X		X		X			
OX174:H2					X			

Serotipo O:H	Origen							
	Al	Av	B	C	H	O	P	V
OX174:H21					X			
OX176:H <sup>-</sup>						X		
OX176:H4						X		
OX177:H <sup>-</sup>			X		X			
OX177:H11			X			X		
OX178:H7					X			
OX178:H19			X					
OX181:H49					X			
OX3:H <sup>-</sup>			X		X	X		

Serotipo O:H	Origen							
	Al	Av	B	C	H	O	P	V
OX3:H2	X		X		X			
OX3:H8			X					
OX3:H19			X					
OX3:H21			X		X			
OX3:H40			X					
OX3:H43			X					
OX3:H49			X					
OX7:H16			X					

**Al**, alimentos; **Av**, aves; **B**, ganado bovino; **C**, ganado caprino; **H**, humanos; **O**, ganado ovino; **P**, ganado porcino; **V**, otros

Fuente <http://www.sciencenet.com.au/vtetable.htm> (parcialmente modificada)



## REFERENCIAS



1. **Acheson, D. W. K. y G. T. Keusch.** 1996. Which Shiga toxin-producing types of *Escherichia coli* are important? *ASM News* **6**:302-306.
2. **Acheson, D. W. K., J. Reidl, X. Zhang, G. T. Keusch, J. J. Mekalanos, y M. K. Waldor.** 1998. *In vivo* transduction with Shiga toxin 1-encoding phage. *Infect. Immun.* **66**:4496-4498.
3. **Ahmed, R., C. Bopp, A. Borczyk, y S. Kasatiya.** 1987. Phage-typing scheme for *Escherichia coli* O157:H7. *J. Infect. Dis.* **155**:806-809.
4. **Ammon, A., L. R. Petersen, y H. Karch.** 1999. A large outbreak of hemolytic uremic syndrome caused by an unusual sorbitol-fermenting strain of *Escherichia coli* O157:H-. *J. Infect. Dis.* **179**:1274-1277.
5. **Anónimo.** 1998. Standard methods for the examination of water and wastewater, 1220 pp, Washinton, D.C.
6. **Anónimo.** 2001. Brot de gastroenteritis per *E. coli* O157:H7 en diferents escoles de Catalunya. *Bol. Epidemiolog. Catalunya.* **22**:59-64.
7. **Armstrong, G. L., J. Hollingsworth, y J. G. Morris, Jr.** 1996. Emerging foodborne pathogens: *Escherichia coli* O157:H7 as a model of entry of a new pathogen into the food supply of the developed world. *Epidemiol. Rev.* **18**:29-51.
8. **Asakura, H., S. Makino, T. Shirahata, T. Tsukamoto, H. Kurazono, T. Ikeda, y K. Takeshi.** 1998. Detection and genetical characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from wild deer. *Microbiol. Immunol.* **42**:815-822.
9. **Ash, R. J., B. Mauck, y M. Morgan.** 2002. Antibiotic resistance of Gram-negative bacteria in rivers, United States. *Emerg. Infect. Dis.* **8**:713-716.
10. **Barker, J., T. J. Humphrey, y M. W. Brown.** 1999. Survival of *Escherichia coli* O157 in a soil protozoan: implications for disease. *FEMS Microbiol. Lett.* **173**:291-295.
11. **Benjamin, M. M. y A. R. Datta.** 1995. Acid tolerance of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:1669-1672.
12. **Bertin, Y., K. Boukhors, N. Pradel, V. Livrelli, y C. Martin.** 2001. Stx<sub>2</sub> subtyping of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle in France: detection of a new Stx<sub>2</sub> subtype and correlation with additional virulence factors. *J. Clin. Microbiol.* **39**:3060-3065.
13. **Betley, M. y J. Mekalanos.** 1985. Staphylococcal enterotoxin A is encoded by a phage. *Science* **229**:185-187.

14. **Bettelheim, K. A.** 1998. Reliability of CHROMagar O157 for the detection of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O157 but not EHEC belonging to other serogroups. *J. Appl. Microbiol.* **85**:425-428.
15. **Bettelheim, K. A.** 1998. Studies of *Escherichia coli* cultured on Rainbow Agar O157 with particular reference to enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC). *Microbiol. Immunol.* **42**:265-269.
16. **Bettelheim, K. A.** 2003. Non-O157 verotoxin-producing *Escherichia coli*: a problem, paradox, and paradigm. *Exp. Biol. Med.*(Maywood.) **228**:333-344.
17. **Bettelheim, K. A., H. Evangelidis, J. L. Pearce, E. Sowers, y N. A. Strockbine.** 1993. Isolation of a *Citrobacter freundii* strain which carries the *Escherichia coli* O157 antigen. *J. Clin. Microbiol.* **31**:760-761.
18. **Beutin, L., D. Geier, H. Steinruck, S. Zimmermann, y F. Scheutz.** 1993. Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-like toxin)-producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy domestic animals. *J. Clin. Microbiol.* **31**:2483-2488.
19. **Beutin, L., E. Strauch, y I. Fischer.** 1999. Isolation of *Shigella sonnei* lysogenic for a bacteriophage encoding gene for production of Shiga toxin. *Lancet* **1**:1498.
20. **Beutin, L., S. Aleksic, S. Zimmermann, y K. Gleier.** 1994. Virulence factors and phenotypical traits of verotoxigenic strains of *Escherichia coli* isolated from human patients in Germany. *Med. Microbiol. Immunol.* **183**:13-21.
21. **Beutin, L., D. Geier, S. Zimmermann, y H. Karch.** 1995. Virulence markers of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* strains originating from healthy domestic animals of different species. *J. Clin. Microbiol.* **33**:631-635.
22. **Beutin, L., S. Zimmermann, y K. Gleier.** 1998. Human infections with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* other than serogroup O157 in Germany. *Emerg. Infect. Dis.* **4**:635-639.
23. **Bielaszewska, M., H. Schmidt, M. A. Karmali, R. Khakhria, J. Janda, K. Blahova, y H. Karch.** 1998. Isolation and characterization of sorbitol-fermenting Shiga toxin (Verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* O157:H- strains in the Czech Republic. *J. Clin. Microbiol.* **36**:2135-2137.
24. **Blanco, J. E., M. Blanco, P. Alonso, A. Mora, G. Dahbi, M. A. Coira, y J. Blanco.** 2004. Serotypes, virulence genes, and intimin types of shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from human patients: prevalence in Lugo, Spain, from 1992 through 1999. *J. Clin. Microbiol.* **42**:311-319.
25. **Blanco, M., J. E. Blanco, A. Mora, G. Dahbi, M. P. Alonso, E. A. González, M. I. Bernández, y J. Blanco.** 2004. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (Verotoxin)-producing *Escherichia*

- coli* isolates from cattle in Spain and identification of a new intimin variant gene (*eae-ζ*). J. Clin. Microbiol. **42**:645-651.
26. **Blanco, M., J. E. Blanco, A. Mora, J. Rey, J. M. Alonso, M. Hermoso, J. Hermoso, M. P. Alonso, G. Dahbi, E. A. Gonzalez, M. I. Bernardez, y J. Blanco.** 2003. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from healthy sheep in Spain. J. Clin. Microbiol. **41**:1351-1356.
  27. **Boerlin, P., S. A. McEwen, F. Boerlin-Petzold, J. B. Wilson, R. P. Johnson, y C. L. Gyles.** 1999. Associations between virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and disease in humans. J. Clin. Microbiol. **37**:497-503.
  28. **Bonjoch, X.** 2001. Enumeració d' *E. coli* O157 en aigües residuals. Departamento de Microbiología. Facultad de Biología. Universidad de Barcelona.
  29. **Borczyk, A. A., H. Lior, y B. Ciebin.** 1987. False positive identifications of *Escherichia coli* O157 in foods. Int. J. Food Microbiol. **4**:347-350.
  30. **Bremer, S. y R. W. Horne.** 1964. A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses. Selected Papers on Virol. Prentice Hall. Inc.
  31. **Brett, K. N., M. A. Hornitzky, K. A. Bettelheim, M. J. Walker, y S. P. Djordjevic.** 2003. Bovine non-O157 Shiga toxin 2-containing *Escherichia coli* isolates commonly possess stx2-EDL933 and/or stx2vhb subtypes. J. Clin. Microbiol. **41**:2716-2722.
  32. **Brown, M. R. W. y J. Barker.** 1999. Unexplored reservoirs of pathogenic bacteria: protozoa and biofilms. Trends Microbiol. **7**:46-50.
  33. **Calderwood, S. B., D. W. K. Acheson, G. T. Keusch, T. J. Barrett, P. M. Griffin, N. A. Strockbine, B. Swaminathan, J. B. Kaper, M. M. Levine, B. S. Kaplan, H. Karch, A. D. O'Brien, T. G. Obrig, Y. Takeda, P. I. Tarr, y I. K. Wachsmuth.** 1996. Proposed new nomenclature for SLT (VT) family. ASM News **62**:118-119.
  34. **Calderwood, S. B. y J. Mekalanos.** 1987. Iron regulation of Shiga-like toxin expression in *Escherichia coli* is mediated by the *fur* locus. J. Bacteriol. **169**:4759-4764.
  35. **Caprioli, A. y A. E. Tozzi.** 1998. Epidemiology of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in continental Europe, p. 1. En J. Kaper and A. D. O'Brien (eds.), *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* strains. ASM Press, Washington, D.C.
  36. **Chalmers, R. M., H. Aird, y F. J. Bolton.** 2000. Waterborne *Escherichia coli* O157. Symp. Ser. Soc. Appl. Microbiol. 124S-132S.

37. **Chang, G. W., J. Brill, y R. Lum.** 1989. Proportion of  $\beta$ -D-glucuronidase negative *Escherichia coli* in human fecal samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:335-339.
38. **Chapman, P. A., C. A. Siddons, A. T. Cerdan-Malo, y M. A. Harkin.** 1997. A 1-year study of *Escherichia coli* O157 in cattle, sheep, pigs and poultry. *Epidemiol. Infect.* **119**:245-250.
39. **Chart, H. y C. Jenkins.** 1999. The serodiagnosis of infections caused by Verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *J. Appl. Microbiol.* **86**:731-740.
40. **Chart, H., S. M. Scotland, y B. Rowe.** 1987. Production of Vero cytotoxin by strains of *Escherichia coli* as related to the availability of iron. *FEMS Microbiol. Lett.* **48**:385-390.
41. **Cherla, R. P., S. Y. Lee, y V. L. Tesh.** 2003. Shiga toxins and apoptosis. *FEMS Microbiol. Lett.* **228**:159-166.
42. **Datz, M., M. C. Janetzki, S. Franke, F. Gunzer, H. Schmidt, y H. Karch.** 1996. Analysis of the enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 DNA region containing lambdoid phage gene *p* and shiga-like toxin structural genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:791-797.
43. **Dominguez, A., P. Gosálvez, M. E. Llorens, T. Llovet, B. Mirelis, E. Planes, G. Prats, y J. Rodriguez.** 2001. Guia per a la prevenció i el control de la infecció per *Escherichia coli* O157:H7 i altres *E. coli* verotoxígenes, 166 pp. Generalitat de Catalunya, Barcelona.
44. **Durán, A. E.** 2001. Comportamiento de los bacteriófagos propuestos como microorganismos modelo frente a diferentes procesos naturales y artificiales en aguas. Tesis Doctoral. Departamento de Microbiología, Universidad de Barcelona, España.
45. **Ehlers, M. M., W. O. K. Grabow, y E. E. Mueller.** 2003. Biolog identification of *Escherichia coli* O157:H7 and other sorbitol-negative bacteria isolated from river water and sewage samples. Abstracts of the International Symposium Health-Related Microbiology. Cape Town (Suráfrica).
46. **Eisenstein, B. I.** 1990. New molecular techniques for microbial epidemiology and the diagnosis of infectious diseases. *J. Infect. Dis.* **161**:595-602.
47. **Fegan, N. y P. Desmarchelier.** 1999. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in sheep and pre-slaughter lambs in eastern Australia. *Lett. Appl. Microbiol.* **28**:335-339.
48. **Finland, M.** 1979. Emergence of antibiotic resistance in hospitals, 1935-1975. *Rev. Infect. Dis.* **1**:4-22.
49. **Fuchs, S., I. Muhldorfer, A. Donohue-Rolfe, M. Kerenyi, L. Emody, R. Alexiev, P. Nenkov, y J. Hacker.** 1999. Influence of RecA on in vivo

- virulence and Shiga toxin 2 production in *Escherichia coli* pathogens. Microb.Pathog. **27**:13-23.
50. **Fujisawa, T., S. Sata, K. Aikawa, T. Takahashi, S. Yamai, y T. Shimada.** 2000. Modification of sorbitol MacConkey medium containing cefixime and tellurite for isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from radish sprouts. Appl. Environ. Microbiol. **66**:3117-3118.
  51. **Fukushima, H., K. Hoshina, y M. Gomyoda.** 1999. Long-term survival of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26, O111, and O157 in bovine feces. Appl. Environ. Microbiol. **65**:5177-5181.
  52. **Gamage, S. D., J. E. Strasser, C. L. Chalk, y A. A. Weiss.** 2003. Nonpathogenic *Escherichia coli* can contribute to the production of Shiga toxin. Infect. Immun. **71**:3107-3115.
  53. **Gannon, V. P. J., R. K. King, J. Y. Kim, y E. J. Golsteyn Thomas.** 1992. Rapid and sensitive method for the detection of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* in ground beef using the polymerase chain reaction. Appl. Environ. Microbiol. **58**:3809-3815.
  54. **Gannon, V. P. J., C. L. Gyles, y R. W. Friendship.** 1988. Characteristics of verotoxigenic *Escherichia coli* isolated from pigs. Can. J. Vet. Res. **52**:331-337.
  55. **Gannon, V. P. J., C. Teerling, S. A. Masrei, y C. L. Gyles.** 1990. Molecular cloning and nucleotide sequence of another variant of the *Escherichia coli* Shiga-like toxin II family. J. Gen. Microbiol. **136**:1125-1135.
  56. **Geldreich, E. E., K. R. Fox, J. A. Goodrich, R. M. Chark, y D. L. Swerdlow.** 1992. Searching for a water supply connection in the Cabool, Missouri disease outbreak of *Escherichia coli* O157:H7. Water Res. **26**:1127-1137.
  57. **Gerhardt, P.** 1994. Methods for general and molecular bacteriology.
  58. **Grant, S. B., C. P. Pendroy, C. L. Mayer, J. K. Bellin, y C. J. Palmer.** 1996. Prevalence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in raw and treated municipal sewage. Appl. Environ. Microbiol. **62**:3466-3469.
  59. **Griffin, P. M.** 2001. Epidemiology of shiga toxin-producing *E. coli* infections in the United States: update, successes, and challenges, p. 56-57. *En G. uffy, P. Garvey, J. Coia, Y. Wasteson, and D. A. McDowell (eds.), Verocytotoxigenic E. coli in Europe, 5. Epidemiology of verocytotoxigenic E. coli.* Teagasc, The National Food Centre, Dublin.
  60. **Griffin, P. M. y R. V. Tauxe.** 1991. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7 other enterohemorrhagic *Escherichia coli* and the associated hemolytic uremic syndrome. Epidemiol.Rev. **13**:60-98.

61. **Guinée, P. A. M., W. H. Jansen, T. Wadström, y R. Sellwood.** 1981. *Escherichia coli* associated with neonatal diarrhoea in piglets and calves. *Curr. Top. Vet. Anim. Sci.* **13**:126-162.
62. **Hanahan, D.** 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J.Mol.Biol.* **166**:557-580.
63. **Hancock, D., T. Besser, J. LeJeune, M. Davis, y D. Rice.** 2001. The control of VTEC in the animal reservoir. *Int. J. Food Microbiol.* **66**:71-78.
64. **Hancock, D. D., T. E. Besser, D. H. Rice, E. D. Ebel, D. E. Herriott, y L. V. Carpenter.** 1998. Multiple sources of *Escherichia coli* O157 in feedlots and dairy farms in the northwestern USA. *Prev. Vet. Med.* **35**:11-19.
65. **Hayashi, T., K. Makino, M. Ohnishi, K. Kurokawa, K. Ishii, K. Yokoyama, C. G. Han, E. Ohtsubo, K. Nakayama, T. Murata, M. Tanaka, T. Tobe, T. Iida, H. Takami, T. Honda, C. Sasakawa, N. Ogasawara, T. Yasunaga, S. Kuhara, T. Shiba, M. Hattori, y H. Shinagawa.** 2001. Complete genome sequence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and genomic comparison with a laboratory strain K-12. *DNA Res.* **8**:11-22.
66. **Henis, Y., K. R. Gurijala, y M. Alexander.** 1989. Factors involved in multiplication and survival of *Escherichia coli* in lake water. *Microb. Ecol.* **17**:171-180.
67. **Hitchcock, P. J. and T. M. Brown.** 1983. Morphological heterogeneity among *Salmonella* lipopolysaccharide chemotypes in silver-stained polyacrilamide gels. *J. Bacteriol.* **154**:269-277.
68. **Hrudey, S. E., P. Payment, P. M. Huck, R. W. Gillham, y E. J. Hrudey.** 2003. A fatal waterborne disease epidemic in Walkerton, Ontario: comparison with other waterborne outbreaks in the developed world. *Water Sci. Technol.* **47**:7-14.
69. **Hunter, P. R. y M. A. Gaston.** 1988. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J. Clin. Microbiol.* **26**:2465-2466.
70. **Ito, H., A. Terai, H. Kurazono, Y. Yakeda, y M. Nishibuchi.** 1990. Cloning and nucleotide sequencing of Vero toxin 2 variant genes from the *Escherichia coli* O91:H21 isolated from a patient with the hemolytic uremic syndrome. *Microb. Pathog.* **8**:47-60.
71. **Iyoda, S., K. Tamura, K. Itoh, H. Izumiya, N. Ueno, K. Nagata, M. Togo, J. Terajima, y H. Watanabe.** 2000. Inducible *stx*<sub>2</sub> phages are lysogenized in the enteroaggregative and other phenotypic *Escherichia coli* O86:HNM isolated from patients. *FEMS Microbiol. Lett.* **191**:7-10.
72. **James, C. E., K. N. Stanley, H. E. Allison, H. J. Flint, C. S. Stewart, R. J. Sharp, J. R. Saunders, y Al. J. McCarthy.** 2001. Lytic and lysogenic infection of diverse *Escherichia coli* and *Shigella* strains with a

- verocytotoxigenic bacteriophage. Appl. Environ. Microbiol. **2001**:4335-4337.
73. **Jenkins, C., N. T. Perry, T. Cheasty, D. J. Shaw, G. Frankel, G. Dougan, G. J. Gunn, H. R. Smith, A. W. Paton, y J. C. Paton.** 2003. Distribution of the *saa* gene in strains of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* of human and bovine origins. J. Clin. Microbiol. **41**:1775-1778.
74. **Johansen, B. K., Y. Wasteson, P. E. Granum, y S. Brynstad.** 2001. Mosaic structure of Shiga-toxin-2-encoding phages isolated from *Escherichia coli* O157:H7 indicates frequent gene exchange between lambdoid phage genomes. Microbiology **147**:1929-1936.
75. **Jores, J., K. Zehmke, J. Eichberg, L. Rumer, y L. H. Wieler.** 2003. Description of a novel intimin variant (type zeta) in the bovine O84:NM verotoxin-producing *Escherichia coli* strain 537/89 and the diagnostic value of intimin typing. Exp. Biol. Med. **228**:370-376.
76. **Kaper, J. B.** 1998. The locus of enterocyte effacement pathogenicity island of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 and other attaching and effacing *E. coli*. Jpn. J. Med. Sci. Biol. **51**:S101-S107.
77. **Karch, H., M. Bielaszewska, M. Bitzan, y H. Schmidt.** 1999. Epidemiology and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. **34**:229-243.
78. **Karch, H., T. Meyer, H. Russmann, y J. Heesemann.** 1992. Frequent loss of Shiga-like toxin genes in clinical isolates of *Escherichia coli* upon subcultivation. Infect. Immun. **60**:3464-3467.
79. **Karch, H., H. Schmidt, C. Janetzki-Mittmann, J. Scheef, y M. Kroger.** 1999. Shiga toxins even when different are encoded at identical positions in the genomes of related temperate bacteriophages. Mol. Gen. Genet. **262**:600-607.
80. **Karmali, M. A.** 1989. Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. Clin. Microbiol. Rev. **2**:15-38.
81. **Karmali, M. A., B. T. Steele, M. Petric, y C. Lim.** 1983. Sporadic cases of haemolytic-uremic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. Lancet **i**:619-620.
82. **Kauffmann, K. M.** 1947. The serology of the coli group. J. Immunol. **57**:71-100.
83. **Keene, W. E., J. M. McAnulty, F. C. Hoesly, L. P. Williams, K. Hedberg, G. L. Oxman, T. J. Barrett, M. A. Pfaller, y D. W. Fleming.** 1994. A swimming-associated outbreak of hemorrhagic colitis caused by *Escherichia coli* O157:H7 and *Shigella sonnei*. N. Engl. J. Med. **331**:579-584.

84. **Kehl, K. S., P. Havens, C. E. Behnke, y D. W. K. Acheson.** 1997. Evaluation of the premier EHEC assay for detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* **35**:2051-2054.
85. **Keskimaki, M., M. Saari, T. Heiskanen, y A. Siitonen.** 1998. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Finland from 1990 through 1997: prevalence and characteristics of isolates. *J. Clin. Microbiol.* **36**:3641-3646.
86. **Khan, A., S. C. Das, T. Ramamurthy, A. Sikdar, J. Khanam, S. Yamasaki, Y. Takeda, y G. B. Nair.** 2002. Antibiotic resistance, virulence gene, and molecular profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from diverse sources in Calcutta, India. *J. Clin. Microbiol.* **40**:2009-2015.
87. **Khan, A., R. K. Nandi, S. C. Das, T. Ramamurthy, J. Khanam, T. Shimizu, S. Yamasaki, S. K. Bhattacharya, W. Chaicumpa, Y. Takeda, y N. G. Balakrish.** 2003. Environmental isolates of *Citrobacter braakii* that agglutinate with *Escherichia coli* O157 antiserum but do not possess the genes responsible for the biosynthesis of O157 somatic antigen. *Epidemiol. Infect.* **130**:179-186.
88. **Kibel, M. A. y P. J. Barnard.** 1968. The hemolytic-uraemic syndrome: a survey in Southern Africa. *S. Afr. Med. J.* **42**:692-698.
89. **Kimmitt, P. T., C. R. Harwood, y M. R. Barer.** 2000. Toxin gene expression by shiga toxin-producing *Escherichia coli*: the role of antibiotics and the bacterial SOS response. *Emerg. Infect. Dis.* **6**:458-465.
90. **Kimura, R., R. E. Mandrell, J. C. Galland, D. Hyatt, y L. W. Riley.** 2000. Restriction-site-specific PCR as a rapid test to detect enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 strains in environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:2513-2519.
91. **Kobayashi, H., A. Miura, H. Hayashi, T. Ogawa, T. Endo, E. Hata, M. Eguchi, y K. Yamamoto.** 2003. Prevalence and characteristics of eae-positive *Escherichia coli* from healthy cattle in Japan. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:5690-5692.
92. **Köhler, B., H. Karch, y H. Schmidt.** 2000. Antibacterials that are used as growth promoters in animal husbandry can affect the release of Shiga-toxin-2-converting bacteriophages and Shiga toxin 2 from *Escherichia coli* strains. *Microbiology* **146**:1085-1090.
93. **Konowalchuk, J., J. I. Speir, y S. Stavric.** 1977. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **18**:775-779.
94. **Kühn, I., G. Allestam, T. A. Stenstrom, y R. Möllby.** 1991. Biochemical fingerprinting of water coliform bacteria, a new method for measuring phenotypic diversity and for comparing different bacterial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:3171-3177.

95. **Kurokawa, K., K. Tani, M. Ogawa, y M. Nasu.** 1999. Abundance and distribution of bacteria carrying stII gene in natural river water. *Lett. Appl. Microbiol.* **28**:405-410.
96. **Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
97. **Laird, W. y N. Groman.** 1976. Orientation of the *tox* gene in the prophage of corynebacteriophage beta. *J. Virol.* **19**:228-231.
98. **Law, D.** 2000. A review: Virulence factors of *Escherichia coli* O157 and other Shiga toxin-producing *E. coli*. *J. Appl. Microbiol.* **88**:729-745.
99. **Lee Lang, A., Y. L. Tsai, C. L. Mayer, K. C. Patton, y C. J. Palmer.** 1994. Multiplex PCR for detection of the heat labile toxin gene and shiga-like toxin I y II genes in *Escherichia coli* isolated from natural waters. *App. Environ. Microbiol.* **60**:3145-3149.
100. **Leung, P. H., J. S. Peiris, W. W. Ng, R. M. Robins-Browne, K. A. Bettelheim, y W. C. Yam.** 2003. A newly discovered verotoxin variant, VT2g, produced by bovine verocytotoxigenic *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.* **69**:7549-7553.
101. **Levine, M. M.** 1987. *E. coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *J. Infect. Dis.* **155**:377-389.
102. **Levine, M. M., J. G. Xu, J. B. Kaper, H. Lior, V. Prado, B. Tall, J. Nataro, H. Karch, y K. Wachsmuth.** 1987. A DNA probe to identify enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and other serotypes that cause hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome. *J. Infect. Dis.* **156**:175-182.
103. **Li, W. y M. A. Drake.** 2001. Development of a quantitative competitive PCR assay for detection and quantification of *Escherichia coli* O157:H7 cells. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:3291-3294.
104. **Licence, K., K. R. Oates, B. A. Synge, y T. M. Reid.** 2001. An outbreak of *E. coli* O157 infection with evidence of spread from animals to man through contamination of a private water supply. *Epidemiol. Infect.* **126**:135-138.
105. **Lindqvist, R., A. K. Antonsson, B. Norling, L. Persson, A.-C. L. Ekstrom, U. Faeger, E. Eriksson, S. Loefdahl, y P. Norberg.** 1998. The prevalence of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) and *E. coli* O157:H7 in beef in Sweden determined by PCR assays and an immunomagnetic separation (IMS) method. *Food Microbiol.* **15**:591-601.
106. **Loedahl, S.** 2001. Shiga toxin producing *E. coli* O157:H7 in Sweden seem to have national characteristics., p. 35-37. *En G. Duffy, P. Garvey, J. Coia, Y. Wasteson, y D. A. McDowell* (eds.), *Verocytotoxigenic E. coli* in Europe, 5. *Epidemiology of verocytotoxigenic E. coli.* Teagasc, The National Food Centre, Dublin.

107. **Makino, K., K. Yokoyama, Y. Kubota, C. H. Yutsudo, S. Kimura, K. Kurokawa, K. Ishii, M. Hattori, I. Tatsuno, H. Abe, T. Iida, K. Yamamoto, M. Onishi, T. Hayashi, T. Yasunaga, T. Honda, C. Sasakawa, y H. Shinagawa.** 1999. Complete nucleotide sequence of the prophage VT2-Sakai carrying the verotoxin 2 genes of the enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 derived from the Sakai outbreak. *Genes Genet. Syst.* **74**:227-239.
108. **Marques, L. R. et al.** 1986. Production of Shiga-like toxin by *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.* **154**:338-341.
109. **Marques, L. R. M., J. S. Peiris, S. J. Cryz, y A. D. O' Brien.** 1987. *Escherichia coli* strains isolated from pigs with edema disease produce a variant of Shiga-like toxin II. *FEMS Microbiol. Lett.* **44**:33-38.
110. **Martins, M. T., I. G. Rivera, D. L. Clark, y B. H. Olson.** 1992. Detection of virulence factors in culturable *Escherichia coli* isolates from water samples by DNA probes and recovery of toxin-bearing strains in minimal o-nitrophenol- $\beta$ -D-galactopyranoside-4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucuronide media. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:3095-3100.
111. **McGowan, K. L., E. Wickersham, y N. A. Strockbine.** 1989. *Escherichia coli* O157:H7 from water. *Lancet* **1**:967-968.
112. **McIngvale, S. C., D. Elhanafi, y M. A. Drake.** 2002. Optimization of reverse transcriptase PCR to detect viable Shiga-toxin-producing *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:799-806.
113. **Mead, P. S. y P. M. Griffin.** 1998. *Escherichia coli* O157:H7. *Lancet* **352**:1207-1212.
114. **Melton-Celsa, A. R. y A. D. O'Brien.** 1998. Structure, biology, y relative toxicity of shiga toxin family members for cells and animals, p. 121-128. *In* J. B. Kaper and A. D. O'Brien (eds.), *Escherichia coli* O157:H7 and other shiga toxin-producing *E. coli* strains. ASM Press, Washington D.C.
115. **Meng, J. y M. P. Doyle.** 1998. Microbiology of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in foods, p. 92-108. *In* J. B. Kaper and A. D. O'Brien (eds.), AMS Press, Washington D.C.
116. **Morabito, S., G. Dell'Omo, U. Agrimi, H. Schmidt, H. Karch, T. Cheasty, y A. Caprioli.** 2001. Detection and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in feral pigeons. *Vet. Microbiol.* **82**:275-283.
117. **Morse, S. S.** 1995. Factors in the emergence of infectious diseases. *Emerg. Infect. Dis.* **1**:7-15.
118. **Mühldorfer, I., J. Hacker, G. T. Keusch, D. W. Acheson, H. Tschäpe, A. V. Kane, A. Ritter, T. Olschlager, y A. Donohue-Rolfe.** 1996. Regulation of the Shiga-like toxin II operon in *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **64**:495-502.

119. **Muniesa, M., M. de Simon, G. Prats, D. Ferrer, H. Panella, y J. Jofre.** 2003. Shiga toxin 2-converting bacteriophages associated with clonal variability in *Escherichia coli* O157:H7 strains of human origin isolated from a single outbreak. *Infect. Immun.* **71**:4554-4562.
120. **Muniesa, M. y J. Jofre.** 1998. Abundance in sewage of bacteriophages that infect *Escherichia coli* O157:H7 and that carry the Shiga toxin 2 gene. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:2443-2448.
121. **Muniesa, M., F. Lucena, y J. Jofre.** 1999. Comparative survival of free shiga toxin 2-encoding phages and *Escherichia coli* strains outside the gut. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:5615-5618.
122. **Muniesa, M., J. Recktenwald, M. Bielaszewska, H. Karch, y H. Schmidt.** 2000. Characterization of a Shiga Toxin 2e-converting bacteriophage from an *Escherichia coli* strain of human origin. *Infect. Immun.* **68**:4850-4855.
123. **Muniesa, M., R. Serra-Moreno, y J. Jofre.** 2004. Free Shiga toxin bacteriophages isolated from sewage showed diversity although the *stx* genes appeared conserved. *Environ. Microbiol.* **In Press**.
124. **Nakao, H., K. Kimura, H. Murakami, T. Maruyama, y T. Takeda.** 2002. Subtyping of Shiga toxin 2 variants in human-derived Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated in Japan. *FEMS Immunol.Med.Microbiol.* **34**:289-297.
125. **Nakao, H. y T. Takeda.** 2000. *Escherichia coli* Shiga toxin. *J. Nat. Toxins.* **9**:299-313.
126. **Nataro, J. P. y J. B. Kaper.** 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* **11**:142-201.
127. **Neely, M. N. y D. Friedman, I.** 1998. Functional and genetic analysis of regulatory regions of coliphage H-19 B: location of Shiga-like toxin and lysis genes suggest a role for phage functions in toxin release. *Mol.Microbiol.* **28**:1255-1267.
128. **Nizetic, D., R. Drmanac, y H. Lehrach.** 1991. An improved bacterial colony lysis procedure enables direct DNA hybridisation using short (10, 11 bases) oligonucleotides to cosmids. *Nucleic Acids Res.* **19**:182.
129. **O'Brien, A. D. y R. K. Holmes.** 1987. Shiga and Shiga-like toxins. *Microbiol. Rev.* **51**:206-220.
130. **O'Brien, A. D. y J. Kaper.** 1998. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: Yesterday, today, and tomorrow, p. 1-11. *En* J. Kaper y A. D. O' Brien (eds.), *Escherichia coli* O157:H7 and other shiga toxin-producing *E. coli* strains. ASM Press, Washington, D.C.
131. **O'Brien, A. D. y G. D. LaVeck.** 1983. Purification and characterization of a *Shigella dysenteriae* 1-like toxin produced by *Escherichia coli*. *Infect Immun.* **40**:675-683.

132. **O'Brien, A. D., G. D. LaVeck, M. R. Thompson, y S. B. Formal.** 1982. Production of *Shigella dysenteriae* type 1-like cytotoxin by *Escherichia coli*. J. Infect. Dis. **146**:763-769.
133. **O'Brien, A. D., J. W. Newland, S. F. Miller, R. K. Holmes, H. W. Smith, y S. B. Formal.** 1984. Shiga-like toxin-converting phages from *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis or infantile diarrhea. Science **226**:694-696.
134. **Ochman, H., J. G. Lawrence, y E. A. Groisman.** 2000. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. Nature **405** :299-304.
135. **Olsen, S. J., G. Miller, T. Breuer, M. Kennedy, C. Higgins, J. Waldorf, G. McKee, K. Fox, W. Bibb, y P. Mead.** 2002. A waterborne outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections and hemolytic uremic syndrome: Implications for rural water systems. Emerg. Infect. Dis. **8**:370-375.
136. **Osawa, R., S. Iyoda, S. I. Nakayama, A. Wada, S. Yamai, y H. Watanabe.** 2000. Genotypic variations of Shiga toxin-converting phages from enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 isolates. J. Med. Microbiol. **49**:565-574.
137. **Oswald, E., H. Schmid, S. Morabito, H. Karch, O. Marches, y A. Caprioli.** 2000. Typing of intimin genes in human and animal enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*: characterization of a new intimin variant. Infect. Immun. **68**:64-71.
138. **Parham, N., J. Spencer, D. Taylor, H. Ternent, G. Innocent, D. Mellor, M. Roberts, y A. Williams.** 2003. An adapted ImmunoMagnetic cell separation method for use in quantification of *Escherichia coli* O157:H7 from bovine faeces. J. Microbiol. Methods **53**:1-9.
139. **Park, C. H., H. J. Kim, D. L. Hixon, y A. Bubert.** 2003. Evaluation of the duopath verotoxin test for detection of shiga toxins in cultures of human stools. J. Clin. Microbiol. **41**:2650-2653.
140. **Paton, A. W., J. C. Paton, M. W. Heuzenroeder, P. N. Goldwater, y P. A. Manning.** 1992. Cloning and nucleotide sequence of a variant Shiga-like toxin II gene from *Escherichia coli* OX3:H21 isolated from a case of sudden infant death syndrome. Microb. Pathog. **13**:225-236.
141. **Paton, A. W. y J. C. Paton.** 1996. *Enterobacter cloacae* producing a Shiga-like toxin II-related cytotoxin associates with a case of hemolytic uremic syndrome. J. Clin. Microbiol. **34**:463-465.
142. **Paton, A. W. y J. C. Paton.** 2002. Direct detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by multiplex PCR for *stx1*, *stx2*, *eae*, *ehxA*, and *saa*. J. Clin. Microbiol. **40**:271-274.
143. **Paton, A. W., P. Srimanote, M. C. Woodrow, y J. C. Paton.** 2001. Characterization of Saa, a novel autoagglutinating adhesin produced by locus of enterocyte effacement-negative Shiga-toxigenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans. Infect Immun. **69**:6999-7009.

144. **Paton, A. W., M. C. Woodrow, R. M. Doyle, J. A. Lanser, y J. C. Paton.** 1999. Molecular characterization of a Shiga toxigenic *Escherichia coli* O113:H21 strain lacking eae responsible for a cluster of cases of hemolytic-uremic syndrome. *J. Clin. Microbiol.* **37**:3357-3361.
145. **Paton, J. C. y A. W. Paton.** 1997. Instability of a Shiga toxin type 2 gene in *Enterobacter cloacae*. *J. Clin. Microbiol.* **35**:1917.
146. **Paton, J. C. y A. W. Paton.** 1998. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clin. Microbiol. Rev.* **11**:450-479.
147. **Perna, N. T., G. F. Mayhew, G. Posfai, S. Elliott, M. S. Sonnenberg, J. B. Kaper, y F. R. Blattner.** 1998. Molecular evolution of a pathogenicity island from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect. Immun.* **66**:3810-3817.
148. **Perna, N. T., G. Plunkett, III, V. Burland, B. Mau, J. D. Glasner, D. J. Rose, G. F. Mayhew, P. S. Evans, J. Gregor, H. A. Kirkpatrick, G. Posfai, J. Hackett, S. Klink, A. Boutin, Y. Shao, L. Miller, E. J. Grotbeck, N. W. Davis, A. Lim, E. T. Dimalanta, K. D. Potamousis, J. Apodaca, T. S. Anantharaman, J. Lin, G. Yen, D. C. Schwartz, R. A. Welch, y F. R. Blattner.** 2001. Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Nature* **409**:529-533.
149. **Pierard, D., G. Muyldermans, L. Moriau, D. Stevens, y S. Lauwers.** 1998. Identification of new verocytotoxin type 2 variant B-subunit genes in human and animal *Escherichia coli* isolates. *J. Clin. Microbiol.* **36**:3317-3322.
150. **Plunkett, G., III, D. J. Rose, T. J. Durfee, y F. R. Blattner.** 1999. Sequence of Shiga toxin 2 phage 933W from *Escherichia coli* O157:H7: Shiga toxin as a phage late-gene product. *J. Bacteriol.* **181**:1767-1778.
151. **Pohl, P.** 1977. Relationship between antibiotic feeding in animals and emergence of bacterial resistance in man. *J. Antimicrob. Chemother.* **72**.
152. **Ramachandran, V., M. A. Hornitzky, K. A. Bettelheim, M. J. Walker, y S. P. Djordjevic.** 2001. The common ovine Shiga toxin 2-containing *Escherichia coli* serotypes and human isolates of the same serotypes possess a Stx<sub>2d</sub> toxin type. *J. Clin. Microbiol.* **39**:1932-1937.
153. **Ratnam, S., S. B. March, R. Ahmed, G. S. Bezanson, y S. Kasatiya.** 1988. Characterization of *Escherichia coli* serotype O157:H7. *J. Clin. Microbiol.* **26**:2006-2012.
154. **Recktenwald, J. y H. Schmidt.** 2002. The nucleotide sequence of Shiga toxin (Stx) 2e-encoding phage phiP27 is not related to other Stx phage genomes, but the modular genetic structure is conserved. *Infect. Immun.* **70**:1896-1908.

155. **Rice, E. W., C. H. Johnson, D. K. Wild, y D. J. Reasoner.** 1992. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in drinking water associated with a waterborne disease outbreak of hemorrhagic colitis. *Lett. Appl. Microbiol.* **15**:38-40.
156. **Rietra, P. J. G. M., G. A. Willshaw, H. R. Smith, A. M. Field, S. M. Scotland, y B. Rowe.** 1989. Comparison of vero-cytotoxin-encoding phages from *Escherichia coli* of human and bovine origin. *J. Gen. Microbiol.* **135**:2307-2318.
157. **Riley, L. W., R. S. Remis, S. D. Helgerson, H. B. McGee, J. G. Wells, B. R. Davis, R. J. Hebert, E. S. Olcott, L. M. Johnson, N. T. Hargrett, P. A. Blake, y M. L. Cohen.** 1983. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N. Engl. J. Med.* **308**:681-685.
158. **Rüssmann, H., H. Schmidt, J. Heesemann, A. Caprioli, y H. Karch.** 1994. Variants of Shiga-like toxin II constitute a major toxin component in *Escherichia coli* O157 strains from patients with haemolytic uraemic syndrome. *J. Med. Microbiol.* **40**:338-343.
159. **Samadpour, M., J. E. Ongerth, J. Liston, N. Tran, D. Nguyen, T. S. Whittam, R. A. Wilson, y P. I. Tarr.** 1994. Occurrence of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* in retail fresh seafood, beef, lamb, pork, and poultry from grocery stores in Seattle, Washington. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:1038-1040.
160. **Samadpour, M., J. Stewart, K. Steingart, C. Addy, J. Louderback, M. McGinn, J. Ellington, y T. Newman.** 2002. Laboratory investigation of an *E. coli* O157:H7 outbreak associated with swimming in Battle Ground Lake, Vancouver, Washington. *J. Environ. Health.* **64**:16-20, 26, 25.
161. **Sambrook, J. y D. W. Russell.** 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual.* 3<sup>rd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor. N. Y.
162. **Sanger, F., A. R. Coulson, G. F. Hong, D. F. Hill, y G. B. Petersen.** 1982. Nucleotide sequence of bacteriophage  $\lambda$  DNA. *J. Mol. Biol.* **162**:729-773.
163. **Satcher, D.** 1995. Emerging infections: getting ahead of the curve. *Emerg. Infect. Dis.* **1**:1-6.
164. **Sato, T., T. Shimizu, M. Watarai, M. Kobayashi, S. Kano, T. Hamabata, Y. Takeda, y S. Yamasaki.** 2003. Distinctiveness of the genomic sequence of Shiga toxin 2-converting phage isolated from *Escherichia coli* O157:H7 Okayama strain as compared to other Shiga toxin 2-converting phages. *Gene* **309**:35-48.
165. **Sato, T., T. Shimizu, M. Watarai, M. Kobayashi, S. Kano, T. Hamabata, Y. Takeda, y S. Yamasaki.** 2003. Genome analysis of a novel Shiga toxin 1 (Stx1)-converting phage which is closely related to Stx2-converting phages but not to other Stx1-converting phages. *J. Bacteriol.* **185**:3966-3971.

166. **Schmidt, H.** 2001. Shiga-toxin-converting bacteriophages. *Res. Microbiol.* **152**:687-695.
167. **Schmidt, H., L. Beutin, y H. Karch.** 1995. Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933. *Infect. Immun.* **63**:1055-1061.
168. **Schmidt, H., M. Bielaszewska, y H. Karch.** 1999. Transduction of enteric *Escherichia coli* isolates with a derivative of Shiga toxin 2-encoding bacteriophage phi3538 isolated from *Escherichia coli* O157:H7. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:3855-3861.
169. **Schmidt, H., C. Geitz, P. I. Tarr, M. Frosch, y H. Karch.** 1999. Non-O157:H7 pathogenic Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: phenotypic and genetic profiling of virulence traits and evidence for clonality. *J. Infect. Dis.* **179**:115-123.
170. **Schmidt, H. y H. Karch.** 1996. Enterohemolytic phenotypes and genotypes of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O111 strains from patients with diarrhea and hemolytic-uremic syndrome. *J. Clin. Microbiol.* **34**:2364-2367.
171. **Schmidt, H., M. Montag, J. Bockemuhl, J. Heesemann, y H. Karch.** 1993. Shiga-like toxin II-related cytotoxins in *Citrobacter freundii* strains from humans and beef samples. *Infect. Immun.* **61**:534-543.
172. **Schmidt, H., J. Scheef, H. I. Huppertz, M. Frosch, y H. Karch.** 1999. *Escherichia coli* O157:H7 and O157:H(-) strains that do not produce Shiga toxin: phenotypic and genetic characterization of isolates associated with diarrhea and hemolytic-uremic syndrome. *J. Clin. Microbiol.* **37**:3491-3496.
173. **Schmidt, H., J. Scheef, S. Morabito, A. Caprioli, L. H. Wieler, y H. Karch.** 2000. A new Shiga toxin 2 variant (Stx<sub>2f</sub>) from *Escherichia coli* isolated from pigeons. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:1205-1208.
174. **Schmitt, C. K., K. C. Meysick, y A. D. O' Brien.** 1999. Bacterial toxins: Friends or foes? *Emerg. Infect. Dis.* **5**:224-234.
175. **Scotland, S. M., T. Cheasty, A. Thomas, y B. Rowe.** 1991. Beta-glucuronidase activity of Vero cytotoxin-producing strains of *Escherichia coli*, including serogroup O157, isolated in the United Kingdom. *Lett. Appl. Microbiol.* **13**:42-44.
176. **Scotland, S. M., H. R. Smith, G. A. Willshaw, y B. Rowe.** 1983. Vero cytotoxin production in a strain of *Escherichia coli* determined by genes carried on bacteriophage. *Lancet* **ii**:216.
177. **Shadix, L. C. y E. W. Rice.** 1991. Evaluation of  $\beta$ -glucuronidase assay for the detection of *Escherichia coli* from environmental waters. *Can. J. Microbiol.* **37**:908-911.

178. **Shaikh, N. y P. I. Tarr.** 2003. *Escherichia coli* O157:H7 Shiga toxin-encoding bacteriophages: integrations, excisions, truncations, and evolutionary implications. *J. Bacteriol.* **185**:3596-3605.
179. **Sharma, V. K. y E. A. Dean-Nystrom.** 2003. Detection of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 by using a multiplex real-time PCR assay for genes encoding intimin and Shiga toxins. *Vet. Microbiol.* **93**:247-260.
180. **Shi, T. y D. Friedman, I.** 2001. The operator-early promoter regions of Shiga-toxin bearing phage H-19B. *Mol. Microbiol.* **2001**:585-599.
181. **Shimada, T., Y. Kosako, Y. Isshiki, y K. Hisatsune.** 1992. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 possesses somatic o antigen identical with that of *Salmonella* O3 01. *Curr. Microbiol.* **25**:215-217.
182. **Slutsker, L., A. A. Ries, K. D. Greene, J. G. Wells, L. Hutwagner, y P. M. Griffin.** 1997. *Escherichia coli* O157:H7 diarrhea in the United States: clinical and epidemiologic features. *Ann. Intern. Med.* **126**:505-513.
183. **Smith, H. W., P. Green, y Z. Parsell.** 1983. Vero cell toxins in *Escherichia coli* and related bacteria: transfer by phage and conjugation and toxic action in laboratory animals, chickens, and pigs. *J. Gen. Microbiol.* **129**:3121-3137.
184. **Son, W. G., T. A. Graham, y V. P. J. Gannon.** 2002. Immunological characterization of *Escherichia coli* O157:H7 intimin  $\gamma$ 1. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **9**:46-53.
185. **Stephan, R. y F. Untermann.** 1999. Virulence factors and phenotypical traits of verotoxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from asymptomatic human carriers. *J. Clin. Microbiol.* **37**:1570-1572.
186. **Strauch, E., R. Lurz, y L. Beutin.** 2001. Characterization of a Shiga toxin-encoding temperate bacteriophage of *Shigella sonnei*. *Infect. Immun.* **69**:7588-7595.
187. **Strockbine, N. A., L. R. M. Marques, J. W. Newland, H. W. Smith, R. K. Holmes, y A. D. O' Brien.** 1986. Two toxin-converting phages from *Escherichia coli* O157:H7 strain 933 encode antigenically distinct toxins with similar biological activities. *Infect. Immun.* **53**:135-140.
188. **Sunagawa, H. y K. Inoue.** 1992. Biological and biophysical characteristics of phages isolated from *Clostridium botulinum* type C and D strains, and physicochemical properties of the phage DNAs. *J. Vet. Med. Sci.* **54**:675-684.
189. **Swerdlow, D. L., B. A. Woodruff, R. C. Brady, P. M. Griffin, S. Tippen, H. D. Jr. Donnell, E. Geldreich, B. J. Payne, A. Jr. Meyher, J. G. Wells, K. D. Greene, M. Bright, N. H. Bean, y P. A. Blake.** 1992. A waterborne outbreak in Missouri of *Escherichia coli* O157:H7 associated with bloody diarrhea and death. *Ann. Intern. Med.* **117**:812-819.

190. **Swinbanks, D.** 1996. Outbreak of *E.coli* infection renews concerns. *Nature* **382**:290.
191. **Tarr, P. I. y M. A. Neill.** 1996. Perspective: The problem of non-O157:H7 Shiga toxin (Verocytotoxin)-producing *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.* **174**:1136-1139.
192. **Teel, L. D., A. R. Melton-Celsa, C. K. Schmitt, y A. D. O'Brien.** 2002. One of two copies of the gene for the activatable shiga toxin type 2d in *Escherichia coli* O91:H21 strain B2F1 is associated with an inducible bacteriophage. *Infect. Immun.* **70**:4282-4291.
193. **Toth, I., H. Schmidt, M. Dow, A. Malik, E. Oswald, y B. Nagy.** 2003. Transduction of porcine enteropathogenic *Escherichia coli* with a derivative of a shiga toxin 2-encoding bacteriophage in a porcine ligated ileal loop system. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:7242-7247.
194. **Trevena, W., R. Hooper, C. Wray, G. Willshaw, T. Cheasty, y G. Domingue.** 1996. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 associated with companion animals. *Vet. Rec.* **138**.
195. **Tsai, C. M. y C. E. Frasch.** 1982. A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* **119**:115-119.
196. **Tschäpe, H., R. Prager, W. Streckel, A. Fruth, E. Tietze, y G. Bohme.** 1995. Verotoxinogenic *Citrobacter freundii* associated with severe gastroenteritis and cases of haemolytic uraemic syndrome in a nursery school green butter as the infection source. *Epidemiol. Infect.* **114**:441-450.
197. **Tyler, S. D., W. M. Johnson, H. Lior, G. Wang, y R. Rozee.** 1991. Identification of Verotoxin type 2 variant B subunit genes in *Escherichia coli* by the polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. *J. Clin. Microbiol.* **29**:1339-1343.
198. **Unkmeir, A. y H. Schmidt.** 2000. Structural analysis of phage-borne *stx* genes and their flanking sequences in shiga toxin-producing *Escherichia coli* and *Shigella dysenteriae* type 1 strains. *Infect. Immun.* **68**:4856-4864.
199. **Vernozy-Rozand, C., M. P. Montet, Y. Bertin, F. Trably, J. P. Girardeau, C. Martin, V. Livrelli, y L. Beutin.** 2004. Serotyping, *stx*<sub>2</sub> subtyping, and characterization of the locus of enterocyte effacement island of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and *E. coli* O157:H7 strains isolated from the environment in France. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:2556-2559.
200. **Vinogradov, E., J. W. Conlan, y M. B. Perry.** 1998. Serological cross-reaction between the lipopolysaccharide O-polysaccharide antigens of *Escherichia coli* O157:H7 and strains of *Citrobacter freundii* and *Citrobacter sedlakii*. *FEMS Microbiol. Lett.* **190**:157-161.

201. **Wagner, P. L., D. W. Acheson, y M. K. Waldor.** 1999. Isogenic lysogens of diverse shiga toxin 2-encoding bacteriophages produce markedly different amounts of shiga toxin. *Infect. Immun.* **67**:6710-6714.
202. **Wagner, P. L., M. N. Neely, X. Zhang, D.-W. K. Acheson, M. K. Waldor, y D. Friedman, I.** 2000. Critical role of the late phage promoter in Stx<sub>2</sub> expression by *E. coli* O157:H7. Abstracts of the General Meeting of the American Society for Microbiology. 449.
203. **Waldor, M. K. y J. J. Mekalanos.** 1996. Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. *Science* **272**:1910-1914.
204. **Wallace, J. S., T. Cheasty, y K. Jones.** 1997. Isolation of Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 from wild birds. *J. Appl. Microbiol.* **82**:399-404.
205. **Wang, G., T. Zhao, y M. P. Doyle.** 1996. Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in bovine feces. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:2567-2570.
206. **Wang, G., C. G. Clark, y F. G. Rodgers.** 2002. Detection in *Escherichia coli* of the genes encoding the major virulence factors, the genes defining the O157:H7 serotype, and components of the type 2 Shiga toxin family by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* **40**:3613-3619.
207. **Wang, G. y M. P. Doyle.** 1998. Survival of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in water. *J. Food Prot.* **61**:662-667.
208. **Wasteson, Y.** 2001. Zoonotic *Escherichia coli*. *Acta Vet. Scand. Suppl.* **95**:79-84.
209. **Watarai, M., T. Sato, M. Kobayashi, T. Shimizu, S. Yamasaki, T. Tobe, C. Sasakawa, y Y. Takeda.** 1998. Identification and characterization of a newly isolated shiga toxin 2-converting phage from shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **66**:4100-4107.
210. **Weeks, C. R. y J. J. Ferretti.** 1984. The gene for type A streptococcal exotoxin (erythrogenic toxin) is located in bacteriophage T12. *Infect. Immun.* **46**:531-536.
211. **Weisburg, W. G., S. M. Barns, D. A. Pelletier, y D. J. Lane.** 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* **173**:697-703.
212. **Wells, J. G., B. R. Davis, I. K. Wachsmuth, L. W. Riley, R. S. Remis, R. Sokolow, y G. K. Morris.** 1983. Laboratory investigation of hemorrhagic colitis outbreaks associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *J. Clin. Microbiol.* **18**:512-520.
213. **Wells, J. G., B. R. Davis, I. K. Wachsmuth, L. W. Riley, R. S. Remis, R. Sokolow, y G. K. Morris.** 1983. Laboratory investigation of hemorrhagic colitis outbreaks associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *J. Clin. Microbiol.* **18**:512-520.

214. **Whittam, T. S., S. D. Reid, y R. K. Selander.** 1998. Mutators and long-term molecular evolution of pathogenic *Escherichia coli* O157:H7. *Emerg. Infect. Dis.* **4**:615-617.
215. **Willshaw, G. A., H. R. Smith, S. M. Scotland, A. M. Field, y B. Rowe.** 1987. Heterogeneity of *Escherichia coli* phages encoding Vero cytotoxins: Comparison of cloned sequences determining VT1 and VT2 and development of specific gene probes. *J. Gen. Microbiol.* **133**:1309-1317.
216. **Wong, C. S., S. Jelacic, R. L. Habeeb, S. L. Watkins, y P. I. Tarr.** 2000. The risk of the hemolytic-uremic syndrome after antibiotic treatment of *Escherichia coli* O157:H7 infections. *N. Engl. J. Med.* **342**:1930-1936.
217. **Wright, D. J., P. A. Chapman, y C. A. Siddons.** 1994. Immunomagnetic separation as a sensitive method for isolating *Escherichia coli* O157 from food samples. *Epidemiol. Infect.* **113**:31-39.
218. **Yoh, M. y T. Honda.** 1997. The stimulating effect of fosfomicin, an antibiotic in common use in Japan, on the production/release of verotoxin-1 from enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in vitro. *Epidemiol. Infect.* **119**:101-103.
219. **Yokoyama, K., K. Makino, Y. Kubota, M. Watanabe, S. Kimura, C. H. Yutsudo, K. Kurokawa, K. Ishii, M. Hattori, I. Tatsuno, H. Abe, M. Yoh, T. Iida, M. Ohnishi, T. Hayashi, T. Yasunaga, T. Honda, C. Sasakawa, y H. Shinagawa.** 2000. Complete nucleotide sequence of the prophage VT1-Sakai carrying the Shiga toxin 1 genes of the enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 strain derived from the Sakai outbreak. *Gene* **258**:127-139.
220. **Yu, J. y J. B. Kaper.** 1992. Cloning and characterization of the eae gene of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Mol. Microbiol.* **6**:411-417.
221. **Zadik, P. M., P. A. Chapman, y C. A. Siddons.** 1993. Use of tellurite for the selection of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157. *J. Med. Microbiol.* **39**:155-158.
222. **Zhang, W., M. Bielaszewska, T. Kuczius, y H. Karch.** 2002. Identification, characterization, and distribution of a Shiga toxin 1 gene variant (*stx<sub>1c</sub>*) in *Escherichia coli* strains isolated from humans. *J. Clin. Microbiol.* **40**:1441-1446.
223. **Zhao, T., M. P. Doyle, J. Shere, y L. Garber.** 1995. Prevalence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in a survey of dairy herds. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:1290-1293.