

Escherichia coli O157 PRODUCTOR DE VEROTOXINA: UN RESUMEN PRÁCTICO

Miguel A. Usera

Sección de Enterobacterias. Servicio de Bacteriología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid.

INTRODUCCIÓN

La importancia de *Escherichia coli* verocitotoxigénicos (VTEC) como agentes causales de toxiinfecciones alimentarias está aumentando en el mundo en general y en Europa en particular. Entre los VTEC, el serotipo más frecuentemente implicado es el O157. En el año 1982 Riley *et al* describieron por primera vez un brote de colitis hemorrágica causado por este serotipo. En el año 1992 tuvo lugar en Estados Unidos otro brote originado por el consumo de hamburguesas poco cocinadas que afectó a varios estados del oeste (Bell *et al*). Posteriormente ha habido otros episodios importantes de características similares en otros países como Japón, Escocia, etc. El país que tiene mayor número de casos es Canadá. Por lo que respecta a España, la incidencia es muy inferior a la existente en otros países, siendo muy escasos los brotes descritos en nuestro país (Margall *et al*; Blanco *et al*).

Escherichia coli verocitotoxigénico causa diarrea que puede cursar con heces sanguinolentas, pudiendo ser considerados como la causa más importante de colitis hemorrágica en los humanos. Esta enfermedad, con síntomas característicos de diarrea sanguinolenta y calambres abdominales, puede agravarse hasta la aparición de un síndrome urémico hemolítico que puede comprometer la vida de paciente y que tiene una tasa de mortalidad entre el 5 y el 10%. En adultos se ha descrito como una causa de púrpura trombótica trombocitopénica (Blanco *et al*).

La patogenicidad de las cepas de VTEC parece estar asociada con varios factores de virulencia, entre los que se incluyen la producción de varias citotoxinas. Estas toxinas se denominan en conjunto verotoxinas o toxinas *Shiga-like*, debido a su gran similitud con la toxina de Shiga de *Shigella dysenteriae* tipo 1. Aunque se conocen más de 60 serotipos de *E. coli* capaces de producirlas, y aún se están describiendo más, el serotipo O157:H7 es el patógeno más importante dentro del grupo VTEC y uno de los más frecuentemente asociados con las infecciones humanas en todo el mundo.

EPIDEMIOLOGÍA

Hasta ahora, el serotipo O157:H7 ha causado más de 60 brotes de toxiinfecciones alimentarias en los Estados Unidos. El consumo de hamburguesas y derivados cárnicos poco cocinados y contaminados explica la mayoría de éstos, aunque también se han descrito brotes producidos por el consumo de leche no higienizada en esta país y en Canadá. La higiene deficiente, junto con la diseminación secundaria por contacto interpersonal, constituye otra vía de transmisión. En los últimos años, sin embargo, ha habido varios brotes producidos por el serotipo O157:H7 en los que se ha implicado a ciertos vehículos de infección poco frecuentes, entre los que se incluyen los alimentos ácidos, frutas, vegetales, yogur y agua.

En el otoño de 1991, se logró realizar el seguimiento de un brote del serotipo O157:H7 que afectó a 23 personas, hasta llegar a implicar en el brote el consumo de sidra recién pisada. Esta sidra, hecha con manzanas caídas sin lavar, tenía un pH de 3,7-3,9; no fue pasteurizada, ni se le añadieron conservantes. Varios estudios de laboratorio demostraron con posterioridad que los aislamientos del serotipo O157:H7 pueden tolerar condiciones ácidas y que algunas cepas persisten en medios que tienen un pH incluso de 2, o en sidra enfriada (8 °C) durante 10-31 días. El origen último del brote no pudo ser inequívocamente establecido, aunque se sospechó que las manzanas caídas estaban contaminadas por estiércol.

En 1993, coincidiendo con una serie de brotes en restaurantes que se relacionaron con otro alimento ácido, fue cuando se logró demostrar la capacidad del serotipo O157:H7 de tolerar la acidez. Aunque no se pudo identificar de forma concluyente la fuente inicial, los estudios epidemiológicos y otros datos apuntaban a la mayonesa o a salsas similares. Tras este brote, varios estudios confirmaron que, aunque algunos aislamientos del serotipo O157:H7 no se multiplican en estas condiciones, sí que podían, sin embargo, mantenerse en la mayonesa comercial hasta 55 días a 5 °C. De nuevo no se pudo probar con certeza la fuente de contaminación por el serotipo O157:H7, si bien se sospechó que la manipulación de la mayonesa o la contaminación de la misma con caldos de carne o productos cárnicos podrá haber sido su origen.

Algunos incidentes recientes demuestran que tanto el agua de consumo como la de uso recreativo pueden servir como vehículo para la transmisión de las infecciones por el *E. coli* O157:H7. En Missouri, en 1989, ocurrió el primer y más importante brote hídrico asociado con este microorganismo. Aunque de nuevo no se identificó la fuente, se sospechó que el reflujo derivado de la rotura de una tubería podría haber contaminado el suministro de agua potable. Como la mayoría de *E. coli*, los aislamientos de este serotipo son sensibles a los efectos del cloro. Los ajustes de la cloración en el suministro de agua durante las reparaciones son, por tanto, decisivos en la prevención de brotes de origen hídrico.

AISLAMIENTO

Las técnicas desarrolladas para aislar VTEC se han dirigido principalmente a aislar el serotipo O157 por su importancia clínica

y por sus especiales características bioquímicas. El aislamiento de otros serotipos VTEC es más complicado y su identificación y caracterización suelen requerir el uso de técnicas moleculares. El estudio de muestras sospechosas de tener *E. coli* O157 debe realizarse tomando las precauciones necesarias para reducir el riesgo de contagio del personal del laboratorio, ya que este microorganismo está catalogado como de nivel de biopeligrosidad 3.

Cuando las muestras no puedan procesarse de forma inmediata en el laboratorio, deben mantenerse refrigeradas entre 2-6 °C hasta un máximo de 48 h. Los hisopos rectales y las muestras de heces que tengan que ser transportadas deben ser incluidas en un medio de transporte, como el Cary-Blair. La muestra se siembra en un medio de McConkey con sorbitol (SMAC), se incuba 24 h a 37 °C y se seleccionan entre tres y cinco colonias sorbitol-negativas. Éstas se aglutinan directamente con suero anti-O157 o mediante una reacción con partículas de látex recubiertas con anticuerpos específicos. Posteriormente, las colonias que muestran una aglutinación positiva se confirman con pruebas convencionales, ya que hay descritas reacciones cruzadas con otras bacterias como *Yersinia enterocolitica* O9, *Escherichia hermannii* y algunos serotipos de *Salmonella* serogrupo N (Lior *et al.*). La realización de la prueba de la β-glucuronidasa, ayuda a la confirmación de *E. coli* O157 ya que dan un resultado negativo, al contrario que la mayoría de las cepas de *E. coli*, que son positivas.

Actualmente hay descritos medios selectivos alternativos al SMAC que pueden utilizarse en los coprocultivos para detectar el serotipo O157 (tabla 1). La importancia de las infecciones causadas por este organismo y la gravedad del síndrome hemolítico urémico y la púrpura trombótica trombocitopénica ha motivado la búsqueda de métodos alternativos que mejoren el porcentaje de aislamientos. Así, el método de separación inmunomagnética que consiste en la utilización de microesferas magnéticas a las que se han pegado anticuerpos anti-O157. Estas partículas se mezclan con el caldo selectivo utilizado, se inmovilizan con un imán, se lavan para eliminar otros microorganismos no unidos a ellas, se siembra el sedimento en un medio selectivo sólido y se incuba a 37 °C durante 24 h para permitir el crecimiento de *E. coli* O157. A partir de este punto se procede como en un coprocultivo normal. También se han desarrollado diferentes técnicas de enzoinmunoensayo que permiten detectar el serotipo O157 en las heces. Por último, un método automático combina la separación inmunomagnética con el enzoinmunoensayo, permitiendo identificar más de 100 muestras en 24 h.

Cuando un laboratorio ha aislado una cepa de *E. coli* O157 productora de verotoxinas debe emitir un informe en el que indique dicho resultado y, si no puede detectar la producción de dichas toxinas por alguno de los métodos recomendados, como la detección de los genes productores de toxina por PCR o la presencia de las toxinas por cultivos celulares, debería enviar dicha cepa a un laboratorio de referencia que confirme dicho aislamiento y detecte la producción de las mencionadas toxinas. El laboratorio de referencia, además de detectar la producción de las verotoxinas 1 y 2, puede confirmar la presencia del antígeno flagelar H7 y la de otros genes relacionados con la virulencia de la cepa, como los genes *eaeA*, *hlyA* y el plásmido pcVD.

Tabla 1. Medios sólidos usados para detectar VTEC.

Agar McConkey Sorbitol (SMAC)
Agar McConkey Sorbitol Modificado (MSMA)
Agar McConkey Sorbitol + Telurito + Cefixima (CT-SMAC)
Agar Eosina Azul de Metileno Modificado (MEMB)
Agar Rainbow
<i>Haemorrhagic coli</i> agar (HC)
Agar Sorbitol rojo de Fenol + MUG (PRS-MUG)
Agar Fluorocult <i>E. coli</i> O157:H7
CHROMagar

APARICIÓN DE VARIANTES FENOTÍPICAS

La técnica de electroforesis multilocular de enzimas llevada a cabo sobre cepas de VTEC demuestra que el serotipo O157:H7 es un grupo bien definido, solo relacionado de forma lejana con otros serotipos productores de toxinas *Shiga-like*. Sin embargo, en Europa se han aislado recientemente diversas variantes fenotípicas de este serotipo, lo que complica las técnicas de diagnóstico empleadas para la detección de este microorganismo.

Los aislamientos del serotipo O157:H7, a diferencia de otros *E. coli*, no fermentan el sorbitol en 24 h y no hidrolizan el metil-umbeliferil-glucuronido u otro sustrato que detecte la actividad β-glucuronidasa. Estos fenotipos, especialmente el caracterizado por la ausencia de fermentación del sorbitol, han sido ampliamente utilizados para distinguir los aislamientos del serotipo O157:H7 de otras bacterias relacionadas. Sin embargo, se han descrito aislamientos del serotipo O157:H7 a partir de alimentos que contienen sorbitol capaces de mutar de un fenotipo no fermentador a otro que sí posee dicha capacidad. Como cabe suponer, esta posibilidad puede tener importantes consecuencias sobre la utilización del fenotipo sorbitol-negativo como método de cribado para detectar estos patógenos en las muestras clínicas. Hay que señalar, no obstante, que estas variantes fenotípicas del serotipo O157:H7 conservan el antígeno O157, por lo que pueden utilizarse los antisueros específicos para identificar el serotipo O157:H7 y sus variantes.

MARCADORES EPIDEMIOLOGICOS

El estudio de los brotes de toxiinfección alimentaria por *E. coli* O157 ha hecho necesario buscar marcadores epidemiológicos que subdividan las cepas de este serotipo. Kakria *et al.* han elaborado un esquema de tipado del serotipo O157 con un buen poder discriminatorio; el método es fácil de usar y permite estudiar un gran número de cepas simultáneamente. Los resultados de la fagotipia de las cepas aisladas de muestras clínicas de origen humano en España reflejan que los fagotipos más frecuentes son el 2 y el 8, según los datos del Laboratorio Nacional de Referencia de Majadahonda.

Entre los métodos de tipado molecular más útiles destaca la electroforesis de campo pulsátil, que ha sido utilizada en diversos países con éxito para el estudio de brotes. Otros marcadores alternativos como el AFLP todavía no han sido suficientemente probados, por lo que no se conoce su utilidad.

BIBLIOGRAFÍA

Akashi S, Joh K, Tsuji A, Ito H, Hoshi H, Hayakawa T, Ihara J, Abe T, Hatori M, Mori T, *et al.* A severe outbreak of haemorrhagic colitis and haemolytic uraemic syndrome associated with *Escherichia coli* O157:H7 in Japan. *Eur J Pediatr* 1994; 153:650-655.

Bell BP, Goldfolt M, Griffin PM, Davis MA, Gordon DC, Tarr PI, Bartleson CA, Lewis JH, Barret TJ, Wells JG, *et al.* A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7-associated bloody diarrhea and hemolytic uremic syndrome from hamburgers: the Washington experience. *JAMA* 1994; 272:1349-1353.

Blanco J, Blanco M, Blanco JE, Alonso MP, Escribano A. Patogénesis, epidemiología y diagnóstico microbiológico de las infecciones producidas por *Escherichia coli* enterohemorrágicas productores de verotoxinas. *Enferm Infec Microbiol Clin* 1993; 11:325-334.

Blanco J, Blanco M, Escribano A, Blanco JE, Alonso MP, Marín J, Hernández R. *Escherichia coli* verotoxigénicos y el síndrome urémico hemolítico. Aspectos clínicos y microbiológicos. *Anal Esp Pediatr* 1995; 42:95-106.

Bohm H, Karch H. DNA fingerprinting of *Escherichia coli* O157:H7 strains by pulsed field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* 1992;30:2169-2172.

Duffy G, Garvey P, Coia Y, Wasteson Y, McDowell DA. Verocytotoxigenic *Escherichia coli* in Europe: 1. Methods for verocytotoxigenic *E. coli*. Teagasc, National Food Centre, Dunsinea, Dublin, 1999.

Khakria R, Duck D, Lior H. Extended phage typing scheme for *Escherichia coli* O157:H7. *Epidemiol Infect* 1990; 105:511-520.

Krishnan C, Fitzgerald VA, Dakin SJ, Behme RJ. Laboratory investigation of outbreak of haemorrhagic colitis caused by *Escherichia coli* O157:H7. *J Clin Microbiol* 1987; 25:1043-1047.

Lior H, Borczyk AA. False positive identification of *Escherichia coli* O157. *Lancet* 1987; 1:333.

Margall N, Dominguez A, Prats G, Salleras L. *Escherichia coli* enterohemorrágica. *Rev Esp Salud Pública* 1997; 71:437-443.

Ratnam S, March SB. Stool survey for *Escherichia coli* O157:H7. *J Infect Dis* 1986; 153:1176-1177.

Riley LW, Remis RS, Helgerson SD, McGee HB, Wells JG, Davis Br, Hebert RJ, Olcott ES, Johnson LM, Hargrett NT, Blake PA, Cohen ML. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N Engl J Med* 1983; 308:681-685.

Sharp JCM, Coia JE, Curnow J, Reilly WJ. *Escherichia coli* O157 infections in Scotland. *J Med Microbiol* 1994; 40:3-9.