



Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Revisión

Escherichia coli enteroagregativa O104:H4-ST678 productora de Stx2a. ¡Diagnóstico microbiológico ya, de este y otros serotipos de STEC/VTEC!

Jorge Blanco

Laboratorio de Referencia de *E.coli* (LREC), Departamento de Microbiología e Parasitología, Universidade de Santiago de Compostela (USC), Campus de Lugo, España

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

On-line el 23 de noviembre de 2011

Palabras clave:

E. coli enteroagregativa
E. coli enterohemorrágica
Toxina Shiga
Serotipo O104:H4

R E S U M E N

Una cepa de *Escherichia coli* productora de la toxina Stx2a (STEC) perteneciente al serotipo O104:H4, que tiene factores de virulencia característicos del patotipo de *E. coli* enteroagregativo, ha causado el reciente (2011) brote de Alemania. La cepa además presenta varios factores de virulencia de cepas de *E. coli* patógenas extraintestinales y ha adquirido resistencia a numerosos antibióticos, incluidas las cefalosporinas de tercera generación, ya que presenta un plásmido que lleva genes que codifican para las β -lactamasas TEM-1 y CTX-M-15. Hay muy pocos reportajes previos sobre el serotipo O104:H4; es muy raro en humanos y nunca se detectó en animales ni alimentos. Una vez que se conoció el serotipo de la cepa del brote alemán se desarrollaron métodos específicos para su detección basados en PCR convencional y en tiempo real. Datos de Galicia sugieren que el serotipo STEC O157:H7 causa más de 500 casos de infección por año y que los STEC no-O157 más de 2.000 casos en España. Por ello, se considera necesario llevar a cabo el diagnóstico microbiológico de las cepas STEC de los serotipos O104:H4, O157:H7 y de otros serotipos en los hospitales españoles.

© 2011 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Stx2a-producing enteroaggregative *Escherichia coli* O104:H4-ST678. Microbiological diagnostic already, for this and other STEC/VTEC serotypes!

S U M M A R Y

A Stx2a-producing *Escherichia coli* (STEC) strain belonging to serotype O104:H4, with virulence features common to the enteroaggregative *E. coli* pathotype, was reported as the cause of the recent 2011 outbreak in Germany. In addition, the German outbreak strain was found to possess several virulence factors of extra-intestinal pathogenic *E. coli* and to have acquired resistance to numerous antibiotics, including third-generation cephalosporins, owing to several plasmid-borne genes encoding TEM-1 and CTX-M-15 β -lactamases. There are only a few reports of serotype O104:H4, which is very rare in humans, and has never been detected in animals or food. Once the serotype of the German outbreak strain became known, specific molecular methods were developed for its detection based on conventional and real-time PCR. Data from Galicia suggest that, per year in Spain, STEC O157:H7 is responsible for more than 500 cases of infection, and non-O157 for more than 2,000. A microbiological diagnosis for O104:H4, O157:H7 and other STEC serotypes is required in Spanish hospitals.

© 2011 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Keywords:

Enteroaggregative *E. coli*
Enterohaemorrhagic *E. coli*
Shiga toxin
O104:H4 serotype

Las cepas de *Escherichia coli* que causan diarrea en seres humanos se clasifican en cinco patotipos: *E. coli* enteropatogénicos (EPEC), enterotoxigénicos (ETEC), enteroinvasivos (EIEC), enteroagregativos (EAEC) y productores de toxinas Shiga/verotoxinas o enterohemorrágicas (STEC/VTEC/EHEC)¹.

El patotipo STEC es un importante patógeno zoonótico emergente que causa patologías muy graves en seres humanos: la colitis hemorrágica (HC) y el síndrome urémico-hemolítico

(HUS)^{2–9}. Aunque las cepas STEC pertenecen a una amplia variedad de serotipos (varios cientos), el más frecuente y virulento es el O157:H7, seguido del O26:H11 (<http://www.usc.es/ecoli/SEROTIPOSUM.htm>). Las cepas elaboran dos potentes citotoxinas denominadas toxinas Shiga/verotoxinas (Stx1/VT1 y Stx2/VT2) que están codificadas en el genoma de profagos. Existen tres subtipos de Stx1 (a, c y d) y siete de Stx2 (a,b,c,d,e,f,g)^{6,10,11}.

Las cepas del patotipo STEC poseen otros factores de virulencia adicionales, siendo el más importante una proteína denominada intimina que es responsable de la íntima adhesión de las bacterias al epitelio intestinal y de la lesión de adhesión y borrado (*attaching*

Correo electrónico: jorge.blanco@usc.es

and effacing)^{12–14}. La intimina (proteína de la membrana externa) se encuentra codificada en el gen *eae*, que forma parte de la isla de patogenidad cromosómica locus for enterocyte effacement (LEE). Las patologías severas en seres humanos se asocian normalmente con las cepas *eae*+ de los serotipos A y B, a las que normalmente se clasifican como enterohemorrágicas^{5,15,16}. La intimina se une al receptor Tir que la bacteria transloca al enterocito por medio de un sistema de secreción tipo III (TTSS), que utiliza para para inyectar numerosas proteínas efectoras (tanto codificadas en la isla LEE como en otros genes) desde el citoplasma bacteriano a los enterocitos^{12–14}.

Karmali et al.¹⁶ han propuesto clasificar los serotipos de las cepas STEC en cinco serotipos, atendiendo a su incidencia y asociación con casos de HUS y brotes. El serotipo A incluye cepas altamente virulentas de los serotipos O157:H7 (no fermentadoras de sorbitol) y O157:H- (H- = no móviles; fermentadoras de sorbitol) causantes de numerosos brotes y frecuentemente asociadas con HUS. El serotipo B incluye serotipos que han causado brotes ocasionales y son relativamente comunes en casos HUS y HC (O26:H11, O103:H2, O111:H8,H-, O121:H19, O145:H-). El serotipo C incluye serotipos no responsables de brotes pero que se han aislado de pacientes con HUS y HC (O5:H-, O91:H21, O104:H21, O113:H21, O121:H-, O165:H25 y otros). El serotipo D incluye serotipos que nunca se han asociado con HUS, pero que sí se han aislados de pacientes con patologías menos graves (diarrea y HC) (O7:H4, O69:H11, O103:H25, O113:H4, O117:H7, O119:H25, O132:H-, O146:H21, O171:H2, O172:H-, O174:H8 y otros). Por último, el serotipo E incluye muchos serotipos aislados de animales, alimentos y del medioambiente no implicados nunca con casos clínicos/enfermedad en humanos. Es por lo tanto muy importante determinar el serotipo de la cepa STEC para poder saber el riesgo patogénico potencial de la misma.

Cepa enteroagregativa O104:H4 Stx2a

El 26 de julio 2011 el Instituto Robert Koch de Berlín daba por finalizado el brote que más casos HUS ha producido en el mundo hasta la fecha¹⁷. Entre el 1 de mayo y el 4 de julio se registraron en Alemania 852 casos HUS y 3.469 casos de diarreas/CH, falleciendo 50 pacientes (incluidos 32 con HUS). Según los datos del European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC)¹⁸ en otros 13 países de la Unión Europea se produjeron 49 casos de HUS y 76 casos de diarrea/CH, incluidos 8 casos HUS del brote de Francia¹⁹ y los dos casos esporádicos de España. Además, también se detectaron algunos casos en EE.UU. y Canadá en pacientes que habían visitado Alemania.

La cepa hipervirulenta causante de los brotes de Alemania y Francia es una cepa atípica en muchos aspectos:

- Se trata de una cepa híbrida de dos patotipos ya que es a la vez enteroagregativa y productora de la toxina Shiga del subtipo Stx2a. La combinación de genes de virulencia de estos patotipos no es frecuente y previamente se había observado en una cepa del serotipo O111:H2 responsable de un pequeño brote en niños con HUS ocurrido en Francia²⁰.
- Pertenece a un serotipo (O104:H4) muy raramente aislado hasta la fecha en pacientes humanos y nunca observado en cepas aisladas de animales ni de alimentos^{21,22}. Tenemos referencias de este serotipo en cepas STEC aisladas en Alemania (2001)²³, Francia (2004)²², Corea (2005)^{24,25}, República de Georgia (2009)²², Italia (2009)²⁶ y Finlandia (2010)²². Las cepas de Alemania, República de Georgia, Italia y Finlandia sabemos que también eran enteroagregativas y productoras de Stx2a. La cepa de Corea no es enteroagregativa y produce Stx1 y Stx2. Por el momento se desconoce si la cepa de Francia es enteroagregativa. También se han aislado cepas enteroagregativas del serotipo O104:H4, pero

no productoras de toxinas Shiga, en la República Centroafricana (1995/1996)²¹, Dinamarca (2000)²² y recientemente en la República de Malí (2009)²² y España (1996) (datos no publicados).

- Carece de la isla de patogenidad LEE que lleva el gen *eae* que está presente en las cepas STEC más virulentas de los serotipos A y B²¹.
- También se diferencia de la mayoría de las cepas de STEC, en que es multiresistente, siendo productora de la beta-lactamasa de espectro extendido CTX-M-15 también presente en el clon intercontinental O25b:H4-ST131^{21,27,28}.

Además de genes de virulencia de STEC y EAEC, la cepa del brote posee factores de virulencia de cepas de *E. coli* patógenas extraintestinales (ExPEC) que también están presentes en cepas del clon O25b:H4-ST131^{21,28,29}.

Si no tuviéramos claro que existe una gran plasticidad en el genoma de *E. coli*, estaríamos pensando en que una cepa que combina tantos genes de virulencia y de resistencia no podría ser más que el fruto de la ingeniería genética. Pero no hay ningún dato que apoye dicha hipótesis, y todo parece indicar que es una de las miles de cepas que emergen continuamente como consecuencia de la transferencia horizontal de genes (fagos, plásmidos y transposones) y deleciones, y es seleccionada por la presión antibiótica. El genoma de *E. coli* contiene entre 4.200 y 5.500 genes, con menos de 2.000 genes conservados (core genome). Su pan-genome (repertorio genético de la especie) es enorme y consiste en al menos 20.000 genes³⁰. Una de las lecciones del brote es la capacidad de especies como *E. coli* de generar nuevas combinaciones de genes que conducen a la emergencia de cepas muy agresivas que además pueden ser resistentes a los antibióticos de mayor utilidad clínica. Hasta ahora, parecía que existía una cierta incompatibilidad entre los genes de resistencia y los genes de virulencia, pero la reciente emergencia del grupo clonal ExPEC O25b:H4-B2-ST131 y de la cepa actual STEAEC O104:H4-B1-ST678 supone un nuevo desafío. Curiosamente estas cepas comparten el antígeno flagelar H4 y el enzima CTX-M-15. No obstante, es necesario precisar que el tratamiento antibiótico en las infecciones causadas por cepas STEC está generalmente contraindicado, ya que el antibiótico puede inducir a la cepa a producir una mayor cantidad de toxinas Shiga, aumentando el riesgo de presentación de HUS. De hecho, se ha podido demostrar que las quinolonas promocionan la producción de Stx2a por parte de la cepa O104:H4 del brote²⁹.

¿Pero cuál es el origen de la cepa enteroagregativa O104:H4 Stx2a?

Se cree que es una cepa nueva probablemente de origen humano que ha emergido recientemente a partir de una cepa enteroagregativa (EAEC) del serotipo O104:H4 que ha adquirido un fago portador del gen *stx2a* a partir de una cepa STEC. A partir de otra cepa adquiriría el plásmido que codifica para el enzima CTX-M-15. Esto se ha deducido después de comparar el genoma completo de varios aislados de la cepa del brote alemán con el genoma de cepas enteroagregativas del serotipo O104:H4 y de otros serotipos, y con el genoma de cepas de otros patotipos de *E. coli* diarreagénicos (ETEC, EPEC, EIEC)^{29,31–33}.

Las cepas de EAEC causan diarreas de larga duración principalmente en niños y viajeros de países del tercer mundo, pero también son una causa significativa de diarrea en Europa, incluida España^{34–36}. Su reservorio son únicamente los seres humanos. Presentan un plásmido (pAA) que codifica para una adhesina fimbrial que es responsable del patrón de adherencia enteroagregativa a células HEp-II y al epitelio intestinal. La cepa responsable del brote actual posee la fimbria AAF/I, mientras que la cepa enteroagregativa y productora de Stx2a aislada en Alemania en el año 2001 poseía la fimbria AAF/III y era sensible a los antibióticos²¹.

¿Por qué la cepa enteroagregativa O104:H4 Stx2a es tan virulenta?

Es evidente que no sorprende el grado de virulencia de la cepa si tenemos en cuenta el gran arsenal de genes de virulencia que tiene la cepa del brote. Pero se desconoce el porqué la cepa O104:H4 es tan virulenta. Se ha especulado con que su capacidad enteroagregativa le permita colonizar mejor el epitelio intestinal y con que tenga mecanismos que le permitan producir o liberar más cantidad de toxina Stx2a. Tiene por lo menos tres adhesinas (AAF/I, LPF-IpfAO26 e Iha), dos sideróforos (aerobactina y yersiniabactina) y tres tipos de proteasas SPATE (Pic, Sig A y SepA). La combinación de estos tres tipos de proteasas se da en muy pocas cepas²⁹.

Semillas de fenogreco importadas de Egipto principales sospechosas

Investigaciones epidemiológicas apoyan la hipótesis de que los brotes de Alemania³⁷ y Francia¹⁹ están relacionados, ya que han sido causados por la misma cepa y por el mismo alimento: brotes obtenidos a partir de semillas de fenogreco importadas de Egipto³⁸. El vehículo más frecuente en los brotes causados por STEC es la carne de vacuno poco cocinada³⁹, pero en los últimos años cada vez son más los brotes causados por productos vegetales, especialmente de ensaladas y brotes de diferentes semillas³⁸. Curiosamente el brote más grande en número de casos de diarrea y CH fue producido por un STEC O157:H7 en el año 1996 en la ciudad de Sakai (Osaka, Japón) y se asoció con el consumo de brotes de rábano⁴⁰. Las cepas EAEC también han causado varios brotes asociados con el consumo de brotes, incluyendo un brote por el serotipo ONT:H10 sucedido en el Japón en 1993 que afectó a más de 2.000 personas⁴¹. En estudios futuros se deberá examinar si las cepas enteroagregativas tienen mecanismos especiales que le permitan adherirse a la superficie de los vegetales. Lo que es evidente que las condiciones de producción de los brotes (humedad y temperatura) favorecen el crecimiento de los microorganismos contaminantes. Se desconoce cómo han podido contaminarse las semillas, pero se supone que puede haberse debido al empleo de agua de riego contaminada con aguas residuales de origen humano.

El hecho de que el número de mujeres afectadas sea mucho mayor de lo normal con respecto a otros brotes por STEC, donde los niños eran los principalmente afectados, se relaciona fundamentalmente con los hábitos culinarios, ya que las mujeres consumen mucho más ensaladas con brotes que los niños.

Contagios persona-persona y portadores asintomáticos

En lo que respecta a los contagios persona-persona vía fecal oral, recordar que el contagio es mucho más frecuente que en otros tipos de infecciones intestinales, ya que la dosis infectiva de las cepas STEC es muy baja (se estima que es de tan solo 100 a 200 bacterias). Por lo tanto, es necesario aislar al paciente y tomar las medidas oportunas para evitar que se contagien los familiares y el personal sanitario. Especial cuidado hay que tener con los niños pequeños, si la afectada es su madre. También se han producido contagios en el personal de laboratorios de diagnóstico, por lo que se deben extremar las medidas de seguridad.

Aunque la cepa O104:H4 puede provocar patologías severas, como CH y HUS, en muchos casos únicamente provoca diarreas autolimitadas que remiten espontáneamente después de unos pocos días, siendo frecuentes los portadores asintomáticos. En este sentido, actualmente provoca preocupación la posible existencia de portadores de larga duración especialmente entre los manipuladores de alimentos. Nosotros hemos observado varios casos en los que los pacientes infectados con diferentes serotipos de STEC continuaban eliminando la misma cepa durante más de 6 meses sin presentar ningún tipo de sintomatología.

Diagnóstico microbiológico de la cepa enteroagregativa O104:H4 Stx2a

En cuanto al diagnóstico microbiológico, comentar que inmediatamente que se conocieron las características de la cepa del brote varios centros (Instituto Robert Koch de Berlín, German National Consulting Laboratory for HUS of Münster University, European Reference Laboratory for *E. coli* de Roma), desarrollaron métodos basados en PCR convencional y en tiempo real para su detección en muestras clínicas y alimentos^{21,42}. En el LREC-USC también desarrollamos una PCR convencional para detectar los genes que codifican los antígenos O104 y H4 que validamos internamente en menos de 1 semana con cepas pertenecientes a los antígenos O (O1 a O181) y H (H1 a H56) reconocidos, y que empleamos para demostrar la ausencia de la cepa enteroagregativa O104:H4 Stx2a en las muestras de pepinos producidos en Andalucía señalados erróneamente e injustificadamente como sospechosos de ser el vehículo del brote de Alemania⁴³.

Se pudo y se debió evitar la llamada crisis del pepino

Es evidente que las autoridades alemanas cometieron un grave error al acusar precipitadamente a los pepinos producidos en Andalucía como causantes del gran brote de Alemania. Se basaban en las encuestas epidemiológicas que implicaban inicialmente a tomates, pepinos y brotes, y en el hecho de haber aislado una cepa STEC de un pepino español del mercado de Hamburgo. Posteriormente se comprobaría que dicha cepa pertenecía a otro serotipo (O8:H19) incluido en el seropatótipo E. Simplemente habría que haber esperado 48 horas para saber si su serotipo y patrón de bandas obtenido por electroforesis en campos pulsantes (PFGE) era el mismo que el de la cepa O104:H4 responsable del brote. Además, la UE lanzó la alerta antes de que el Laboratorio de Referencia de *E. coli* para alimentos alemán (German National Reference Center for *E. coli*, Federal Institute for Risk Assessment, BfR, Berlín) determinase el serotipo de la cepa aislada de los pepinos españoles.

Las hortalizas producidas en España tienen una buena calidad higiénico-sanitaria

Después de demostrar que los pepinos producidos en España estaban libres de la cepa STEC O104:H4 y que tenían una calidad higiénico-sanitaria excelente (menos de 10 ufc de *E. coli* por gramo), realizamos un amplio muestreo en hortalizas producidas en nuestro país y puestas a la venta en grandes superficies y pequeños establecimientos comerciales. Se procesaron 200 muestras de hortalizas (junio y julio de 2011), resultando todas negativas para la cepa hipervirulenta del serotipo O104:H4 y únicamente 1 (0,5%) de verdura positiva para una cepa del serotipo O146:H21 (con los genes *stx1* y *stx2*) considerado de baja virulencia (categoría D). A pesar del caso positivo detectado la calidad higiénico sanitaria de las hortalizas resultó ser muy buena, ya que 195 (98%) de las muestras presentaron menos de 10 ufc de *E. coli* por gramo. No obstante, es evidente que debe seguir recomendándose que se laven bien los vegetales antes de su consumo en fresco. Algo que nos preocupaba mucho eran las ensaladas que vienen en bolsas listas para consumir sin lavar, pero afortunadamente las 41 muestreadas resultaron todas negativas⁴³.

Es urgente iniciar la búsqueda de las cepas STEC en coprocultivos

Seguramente, los microbiólogos clínicos se están planteando en estos momentos la necesidad de realizar la detección de la cepa O104:H4 y de otros tipo de cepas enterohemorrágicas

(especialmente, las de los serotipos responsables de la mayoría de los casos HUS, los serotipos A y B). Es evidente que es ahora o nunca. Hay una cepa hipervirulenta que está circulando y que podría ocasionar problemas muy graves, y nuestros hospitales deben estar preparados para realizar su diagnóstico. Coincidió con la recomendación del CDC de Atlanta⁴⁴ en que se realice la detección de todos los serotipos de STEC, tanto del O157:H7 como de los no-O157, en todo tipo de diarreas comunitarias. Tanto en las diarreas sanguinolentas como en las acuosas, e incluso en las consideradas como posibles diarreas víricas y a lo largo de todo el año.

En el año 2007, la incidencia por 100.000 habitantes de infecciones por STEC O157:H7 y no O157 en EE.UU. era de 1,19 y 0,59, respectivamente. En la UE, la incidencia en 2006/2007 era 1,1 y 0,6, respectivamente. El 70% de las infecciones en EE.UU. eran atribuidas al serotipo O157:H7, mientras que en Europa únicamente el 50%. Se estima que las cepas STEC producen en EE.UU. más de cien mil casos de infección por año (73.500 por el serotipo O157:H7 y 37.000 por otros serotipos)⁴⁵. En el año 2000 el 95% de los laboratorios realizaban el diagnóstico del serotipo O157:H7 y tan solo el 3% usaban un método que permitía detectar los no-O157. Los datos del año 2008 muestran que eran ya el 35% los laboratorios que realizaban la detección de todas las cepas STEC en EE.UU.⁴⁶. Entre los años 2005 a 2009, los estados miembros de la UE han comunicado 16.263 casos confirmados de infecciones por cepas STEC¹⁸. Concretamente en el año 2009, se comunicaron 3.573 casos. Los estados que comunicaron más de 100 casos en dicho año fueron: Dinamarca (160 casos), Alemania (878 casos), Irlanda (237 casos), Holanda (313 casos), Suecia (228 casos) y el Reino Unido (1.339 casos). En el año 2009, la tasa de notificación por 100.000 habitantes era de 0,75. Solamente se produjeron entre 2 y 6 muertes anuales por año entre 2006 y 2009 en Europa¹⁸.

España únicamente comunicó 14 casos en el año 2009, lo que refleja que posiblemente en la mayoría de los hospitales españoles no se realizaba la detección de las cepas de STEC. El LREC-USC en colaboración con los Servicios de Microbiología del Hospital Lucus Augusti de Lugo y Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela (CHUS) ha realizado la detección de STEC O157:H7 y de otros serotipos en un total de 15.441 coprocultivos entre los años 1992 y 2011 usando una PCR convencional que detecta los genes *stx1* y *stx2*. Las cepas O157:H7 se aislaron en 76 casos (0,5%) y las no-O157 en 267 casos (1,7%)^{5,43}. A partir de estos datos estimamos que actualmente se pueden estar produciendo en España del orden de 500 infecciones por el serotipo O157:H7 y más de 2.000 por cepas de otros serotipos. Creemos que estas cifras son suficientemente significativas y justifican la necesidad de realizar el diagnóstico.

Cerca del 70% de las cepas STEC aisladas de pacientes de Lugo y Santiago de Compostela presentaron el gen *eae* y aproximadamente el 60% se pudieron englobar en un reducido número de serotipos (O5:H-, O26:H11, O103:H2, O111:H-, O113:H21, O118:H16, O145:H-, O146:H21 y O157:H7) en su mayoría incluidos dentro de las seropatótipos A y B de Karmali et al.¹⁶. Los serotipos O26:H11 y O157:H7, como ocurre en casi todo el mundo, son los dos más frecuentemente aislados en España, suponiendo más del 35% de las cepas STEC. Entre las 368 cepas humanas STEC serotipadas no encontramos ninguna perteneciente al serogrupo O104^{5,43}.

¿Qué medios de cultivo y técnicas se pueden emplear para detectar las cepas STEC?

Lo primero remarcar la importancia de recoger la muestra fecal durante los primeros días de la diarrea, ya que los coprocultivos se pueden negativizar muy pronto. En los casos HUS muchas veces únicamente se consigue aislar la cepa en los coprocultivos del prodromo de diarrea². Sin lugar a dudas el medio

mejor para recuperar y aislar las cepas STEC es el agar MacConkey con telurito y cefixima (CT-SMAC)⁵. Este medio es adecuado para las cepas del serotipo O157:H7 (no fermentadoras de sorbitol y beta-glucuronidasa negativas) y también para los serotipos *eae*+ incluidos en el seropatótipo B (fermentadores de sorbitol y beta-glucuronidasa positivos), y para la cepa O104:H4 del brote (fermentadora de sorbitol y beta-glucuronidasa positiva). No obstante, en este medio no crecen las cepas del serotipo O157:H-fermentadoras de sorbitol y beta-glucuronidasa positivas que son muy virulentas y abundan especialmente en Alemania. Estas cepas y el resto de las cepas STEC no O157 sin la isla de patogenicidad LEE se pueden recuperar en agar MacConkey clásico con lactosa, que también es adecuado para el aislamiento de ECEP, ETEC, EIEC y EAEC. Para la cepa O104:H4 del brote también se puede emplear un medio selectivo para cepas productoras de BLEE, pero este tipo de medios no son adecuados para aislar la mayoría de las cepas de otros serotipos STEC (incluidas las O157:H7 y O26:H11) ya que no producen BLEE⁴⁷.

En el LREC-USC nosotros empleamos una técnica de PCR convencional para detectar los genes *stx1* y *stx2* utilizando el ADN extraído de mezcla de cultivos obtenidos a partir de la zona de crecimiento confluyente de las placas de agar MacConkey y CT-SMAC. En caso positivo posteriormente se deben localizar las colonias STEC y para ello examinamos primero un pool formado por unas diez colonias entre las que normalmente se van a encontrar varias positivas. La gran ventaja de la PCR es que también permite saber si la cepa posee el gen *eae* asociado con los seropatótipos A y B más virulentos, establecer si es enteroagregativa e incluso serotipar molecularmente la cepa.

Otros grupos emplean una PCR en tiempo real, un procedimiento que ya está disponible comercialmente. Según nuestra información al menos cinco casas comerciales tienen disponibles kits que permite detectar los genes *stx1* y *stx2* (TaqMan VT1 y VT2 assays, Applied Biosystems-Life Technologies; Mericon VTEC *stx1/2* kit, Qiagen; PCRFast VTEC *stx1/2*, Nova-Tec Immundiagnostica GMBH; EHEC Real Time PCR kit DNA I-II, Gentaur Molecular Products; PCR kit Muta-Fast VTEC *stx1/2*, Immundiagnostik), e incluso existe un kit para detectar específicamente la cepa O104:H4 en alimentos basada en el protocolo propuesto por el Laboratorio Europeo de Referencia de *E. coli* del Istituto Superiore di Sanità de Roma⁴² (TaqMan O104:H4 assay, Applied Biosystems-Life Technologies). También está disponible un kit para detectar por hibridación los genes *stx1*, *stx2* y *eae* (GenoType EHEC, Hain Lifescience). Por su parte, los arrays de ADN permiten detectar a la vez numerosos genes^{13,48}. El desarrollado por Bugarel et al.⁴⁸ basado en la tecnología GeneDisc permite detectar 15 genes de virulencia, 12 genes de antígenos O y 7 genes de antígenos H, y permite determinar el potencial de virulencia de la cepa y los serotipos de mayor interés clínico. Posiblemente en los próximos meses la oferta disponible de métodos genéticos aumente de forma muy significativa.

Otra posibilidad es utilizar un método inmunológico capaz de detectar las diferentes variedades de toxinas Stx1 y Stx2. El CDC⁴⁴ ha aprobado varios que tienen una sensibilidad y especificidad muy elevadas: BioStar OIA Shigatoxin (Inverness Medical Professional Diagnostics), Duopath Verotoxins (Merck), ImmunoCardSTAT EHEC (Meridian Diagnostics) y Premier EHEC (Meridian Diagnostics). Otro que tiene también buenas referencias es el VTEC-RPLA (Denka Seiken)¹⁰. En el LREC-USC hemos trabajado con uno de ellos (ELISA de Premier EHEC) y nuestra experiencia es muy positiva ya que hemos encontrado una correlación muy buena con el ensayo de PCR convencional. Como el CDC, recomendamos utilizar dichos ensayos inmunológicos para ensayar los cultivos (zona de crecimiento confluyente de la placa de CT-SMAC), mejor que para detectar directamente las toxinas en heces. Recientemente Feng et al.¹⁰ han demostrado que los ensayos inmunológicos no detectan todas las subtipos de Stx conocidas. Los cuatro ensayados

(VTEC-RPLA, ImmunoCardSTAT, Premier EHEC y ProsSpecT) fallaron en detectar los subtipos Stx2b, Stx2c, Stx2e, y Stx2g, tres de ellos el subtipo Stx2f y dos el subtipo Stx1c. No obstante, los cuatro son capaces de detectar los subtipos Stx2a y Stx2d que son los más importantes ya que son producidas normalmente por las cepas de los serotipos más virulentos.

Por supuesto, también coincido con el CDC⁴⁴ en la necesidad de que las cepas STEC aisladas deban ser enviadas a un laboratorio de referencia de *E. coli* para que se pueda completar su caracterización, incluyendo la determinación del serotipo O:H, la secuencia tipo por MLST y el perfil de macrorrestricción con el enzima *XbaI* por PFGE, y compararlas con las cepas aisladas con anterioridad en España. En nuestro país las cepas se podrían enviar al Centro Nacional de Microbiología (CNM) y al LREC-USC⁴⁹.

El WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Escherichia* and *Klebsiella* (Staten Serum Institut, Copenhagen) y el EU Reference Laboratory for *E. coli* (Istituto Superiore di Sanità, Roma) tienen un programa de calidad externo (VTEC International External Quality Assurance) apoyado por el ECDPC, en que ha participado nuestro laboratorio y el CNM y otros 43 laboratorios de 38 países que controla especialmente las capacidades de serotipado, determinación de los subtipos de Stx1 y Stx2, y del gen *eae*¹⁰.

¿Pero también se tendría que realizar el diagnóstico de otros patotipos de *E. coli* diarreagénicos?

En los coprocultivos de pacientes con gastroenteritis aguda realizados en colaboración con la Unidad de Microbiología Clínica del Hospital Lucus Augusti de Lugo durante el año 2011 la prevalencia de enteropatógenos bacterianos fue: EPEC atípicos *eae+* (12,6%); *Campylobacter jejuni* (7,1%), *Salmonella* serotipo Typhimurium (3,3%), *Salmonella* serotipo Typhimurium (3,1%), STEC/VTEC (1,8%), EAEC (1,2%), EPEC típicos *eae+* y *bfpA+* (0,9%), *Yersinia enterocolitica* (0,6%), ETEC (0,3%), *Aeromonas hydrophila* (0,2%), *Shigella* (0%) y EIEC (0%).

Es evidente que también se debería abordar el diagnóstico de los otros patotipos de *E. coli* diarreagénicos, pero vayamos paso a paso. Lo mismo que con el patotipo STEC/VTEC/EHEC las cepas de los otros patotipos pertenecen a múltiples serotipos que presentan un potencial de virulencia y una significación clínica muy variable^{1,35,36,50,51,52}. Especialmente problemático es el caso representado por el patotipo EPEC atípico, ya que aunque han provocado algunos brotes con cientos de pacientes implicados, también se aíslan con frecuencia en coprocultivos de controles sanos.

Su detección se tiene que realizar por métodos genéticos (PCR convencional, PCR en tiempo real, hibridación y arrays de ADN). En el LREC-USC nosotros empleamos una técnica de PCR convencional para detectar EPEC típicos y atípicos, ETEC, EIEC y EAEC utilizando el ADN extraído de cultivos obtenidos a partir de la zona de crecimiento confluyente de la placa de agar MacConkey^{36,43}. Ya hay disponibles varios kits comerciales para detectar todos los patotipos de *E. coli* diarreagénicos (Gentaur Molecular Products) y seguro que en los próximos años dispondremos de nuevos kits moleculares que permitirán realizar su detección de forma rápida, simple y económica.

Bibliografía

- Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev. 1998;11:142–201.
- Blanco J, Blanco M, Blanco JE, Blanco MP, Escribano A. Patogénesis, epidemiología y diagnóstico microbiológico de las infecciones producidas por *Escherichia coli* enterohemorrágicos productores de verotoxinas. Enferm Infecc Microbiol Clin. 1993;11:324–34.
- Blanco M, Blanco JE, Mora A, Rey J, Alonso JM, Hermoso M, et al. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from healthy sheep in Spain. J Clin Microbiol. 2003;41:1351–65.
- Blanco M, Blanco JE, Mora A, Dahbi G, Alonso MP, González EA, et al. 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-xi*). J Clin Microbiol. 2004;42:645–51.
- Blanco JE, Blanco M, Alonso MP, Mora A, Dahbi G, Coira MA, et al. 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. 2004;42:311–9.
- Gyles CL. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. J Anim Sci. 2007;85(S):E45–62.
- Latorre-Martínez JC, García-Lozano T, Blanco J, Buesa J. Caracterización de cepas de *Escherichia coli* O157:H7 aisladas de casos esporádicos de síndrome hemolítico urémico en niños. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2007;25:603–4.
- Prats G, Frías C, Margall N, Llovet T, Gaztelurrutia L, Elcuzar R, et al. Colitis hemorrágica por *Escherichia coli* verotoxigénica. Enferm Infecc Microbiol Clin. 1996;14:7–15.
- Sánchez S, Martínez R, Alonso JM, Rey J. Aspectos clínicos y patogénicos de las infecciones por *Escherichia coli* O157:H7 y otros *E. coli* verotoxigénicos. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2010;28:370–4.
- Feng PC, Jinneman K, Scheutz F, Monday SR. Specificity of PCR and serological assays in the detection of *Escherichia coli* Shiga toxin subtypes. Appl Environ Microbiol. 2011;77:6699–702.
- Muniesa M, De Simon M, Prats G, Ferrer D, Pañella H, Jofre J. 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. 2003;71:4554–62.
- Garmendia J, Frankel G, Crepin VF. Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections: translocation, translocation, translocation. Infect Immun. 2005;73:2573–85.
- Garrido P, Blanco M, Moreno-Paz M, Briones C, Dahbi G, Blanco JE, et al. STEC-EPEC oligonucleotide microarray: a new tool for typing genetic variants of the LEE pathogenicity island of human and animal Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) strains. Clin Chem. 2006;52:192–201.
- Mora A, Blanco M, Yamamoto D, Dahbi G, Blanco JE, López C, et al. HeLa-cell adherence patterns and actin aggregation of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and Shiga-toxin-producing *E. coli* (STEC) strains carrying different *eae* and *tir* alleles. Int Microbiol. 2009;12:243–51.
- Beutin L, Krause G, Zimmermann S, Kauffuss S, Gleier K. Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from human patients in Germany over a 3-year period. J Clin Microbiol. 2004;42:1099–108.
- Karmali MA, Mascarenhas M, Shen S, Ziebell K, Johnson S, Reid-Smith R, et al. Association of genomic O island 122 of *Escherichia coli* EDL 933 with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* seropathotypes that are linked to epidemic and/or serious disease. J Clin Microbiol. 2003;41:4930–40.
- Robert Koch Institute (RKI). EHEC/HUS O104:H4—The outbreak is considered to be over [consultado 29 Ago 2011]. <http://www.rki.de/clin.117/nn.217400/EN/Home/PM...EHEC.html>.
- European Centre for Disease Prevention and Control and European Food Safety Authority. Shiga toxin/verotoxin-producing *Escherichia coli* in humans, food and animals in the EU/EEA with special reference to the German outbreak strain STEC O104. Stockholm: ECDC; 2011. doi:10.2900/55055.
- Gault G, Weill F, Mariani-Kurkdjian P, Jourdan-da Silva N, King L, Aldabe B, et al. Outbreak of haemolytic uraemic syndrome and bloody diarrhoea due to *Escherichia coli* O104:H4, south-west France, June 2011. Euro Surveill. 2011;16, pii: 19905.
- Morabito S, Karch H, Mariani-Kurkdjian P, Schmidt H, Minelli F, Bingen E, et al. Enterohemorrhagic Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O111:H2 associated with an outbreak of hemolytic-uremic syndrome. J Clin Microbiol. 1998;36:840–2.
- Bielaszewska M, Mellmann A, Zhang W, Köck R, Fruth A, Bauwens A, et al. Characterisation of the *Escherichia coli* strain associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, 2011: a microbiological study. Lancet Infect Dis. 2011;11:671–6. Epub 2011 Jun 22.
- Scheutz F, Møller Nielsen E, Frimodt-Møller J, Boisen N, Morabito S, Tozzoli R, et al. Characteristics of the enterohemorrhagic Shiga toxin/verotoxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 strain causing the outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, May to June 2011. Euro Surveill. 2011;16, pii: 19889.
- Mellmann A, Bielaszewska M, Köck R, Friedrich AW, Fruth A, Middelndorf B, et al. Analysis of collection of hemolytic uraemic syndrome-associated enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Emerg Infect Dis. 2008;14:1287–90.
- Bae WK, Lee YK, Cho MS, Ma SK, Kim SW, Kim NH, et al. A case of hemolytic uraemic syndrome caused by *Escherichia coli* O104:H4. Yonsei Med J. 2006;47:437–9.
- Kim J, Oh K, Jeon S, Cho S, Lee D, Hong S, et al. *Escherichia coli* O104:H4 from 2011 European outbreak and strain from South Korea. Emerg Infect Dis. 2011;17:1755–6.
- Scavia G, Morabito S, Tozzoli R, Michelacci V, Marziano ML, Minelli F, et al. Similarity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 strains from Italy and Germany. Emerg Infect Dis. 2011 Oct; [Epub ahead of print]. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1710.111072>.
- Blanco M, Alonso MP, Nicolas-Chanoine MH, Dahbi G, Mora A, Blanco JE, et al. Molecular epidemiology of *Escherichia coli* producing extended-spectrum β -lactamases in Lugo (Spain): dissemination of clone O25b:H4-ST131 producing CTX-M-15. J Antimicrob Chemother. 2009;63:1135–41.

28. Blanco J, Mora A, Mamani R, López C, Blanco M, Dahbi G, et al. National survey of *Escherichia coli* causing extraintestinal infections reveals the spread of drug-resistant clonal groups O25b:H4-B2-ST131, O15:H1-D-ST393 and CGA-D-ST69 with high virulence gene content in Spain. *J Antimicrob Chemother.* 2011;66:2011–21.
29. Rasko DA, Webster DR, Sahl JW, Bashir A, Boisen N, Scheutz F, et al. Origins of the *E. coli* Strain Causing an Outbreak of Hemolytic-Uremic Syndrome in Germany. *N Engl J Med.* 2011;365:709–17. Epub 2011 Jul 27.
30. Touchon M, Hoede C, Tenaillon O, Barbe V, Baeriswyl S, Bidet P, et al. Organised genome dynamics in the *Escherichia coli* species results in highly diverse adaptive paths. *PLoS Genet.* 2009;5:e1000344.
31. Brzuszkiewicz E, Thürmer A, Schuldes J, Leimbach A, Liesegang H, Meyer FD, et al. Genome sequence analyses of two isolates from the recent *Escherichia coli* outbreak in Germany reveal the emergence of a new pathotype: Enterotoxin-producing-Haemorrhagic *Escherichia coli* (EAHEC). *Arch Microbiol.* 2011; doi:10.1007/s00203-011-0725-6.
32. Mellmann A, Harmsen D, Cummings CA, Zentz EB, Leopold SR, Rico A, et al. Prospective genomic characterization of the German enterohemorrhagic *Escherichia coli* O104:H4 outbreak by rapid next generation sequencing technology. *PLoS One.* 2011;6:e22751.
33. Rohde H, Qin J, Cui Y, Li D, Loman NJ, Hentschke M, et al. Open-Source Genomic Analysis of Shiga-Toxin-Producing *E. coli* O104:H4. *N Engl J Med.* 2011;365:718–24. Epub 2011 Jul 27.
34. Mendez-Arancibia E, Vargas M, Soto S, Ruiz J, Kahigwa E, Schellenberg D, et al. Prevalence of different virulence factors and biofilm production in enterotoxin-producing *Escherichia coli* isolates causing diarrhea in children in Ifakara (Tanzania). *Am J Trop Med Hyg.* 2008;78:985–9.
35. Piva IC, Pereira AL, Ferraz LR, Silva RS, Vieira AC, Blanco JE, et al. Virulence markers of enterotoxin-producing *Escherichia coli* isolated from children and adults with diarrhea in Brasília, Brazil. *J Clin Microbiol.* 2003;41:1827–32.
36. Blanco M, Blanco JE, Dahbi G, Alonso MP, Mora A, Coira MA, et al. Identification of two new intimin types in atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *Int Microbiol.* 2006;9:103–10.
37. Frank C, Werber D, Cramer JP, Askar M, Faber M, Heiden MA, et al., the HUS Investigation Team. Epidemic Profile of Shiga-Toxin-Producing *Escherichia coli* O104:H4 Outbreak in Germany - Preliminary Report. *N Engl J Med.* 2011 Jun 22. [Epub ahead of print], doi:10.1056/NEJMoa1106483.
38. European Food Safety Authority (2011): Tracing seeds, in particular fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) seeds, in relation to the Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) O104:H4 2011 Outbreaks in Germany and France.
39. Mora A, Blanco M, Blanco JE, Dahbi G, López C, Justel P, et al. Serotypes, virulence genes and intimin types of Shiga toxin (verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from minced beef in Lugo (Spain) from 1995 through 2003. *BMC Microbiol.* 2007;7:13.
40. Michino H, Araki K, Minami S, Takaya S, Sakai N, Miyazaki M, et al. (1999) Massive outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection in schoolchildren in Sakai City, Japan, associated with consumption of white radish sprouts. *Am J Epidemiol.* 1999;150:787–96.
41. Itoh Y, Nagano I, Kunishima M, Ezaki T. Laboratory investigation of enterotoxin-producing *Escherichia coli* O untypeable:H10 associated with a massive outbreak of gastrointestinal illness. *J Clin Microbiol.* 1997;35:2546–50.
42. EU Reference Laboratory for *E. coli*. EU Reference Laboratory for *E. coli*. (EU-RL VTEC). Detection and identification of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) O104:H4 in food by real Time PCR. Rome: Istituto Superiore di Sanità; 2 Jun 2011 [consultado 29 Ago 2011]. Disponible en: <http://www.iss.it/binary/vtec/cont/Lab.Proc.VTEC.O104.pdf>.
43. Mora A, Herrera A, López C, Dahbi G, Mamani R, Pita JM, et al. Characteristics of the Shiga-toxin-producing enterotoxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 German outbreak strain and STEC isolated in Spain. *Int Microbiol.* 2011. doi: 10.2436/20.1501.01.142.
44. Gould LH, Bopp C, Strockbine N, Atkinson R, Baselski V, Body B, et al. Recommendations for diagnosis of shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections by clinical laboratories. *MMWR Recomm Rep.* 2009;58(RR-12):1–14.
45. Kaspar C, Doyle ME, Archer J. FRI Food Safety Review: non-O157:H7 Shiga toxin-producing *E. coli* from meat and non-meat sources. Food Research Institute, UW-Madison, 2009 [consultado 29 Ago 2011]. Disponible en: <http://fri.wisc.edu/docs/pdf/FRI.Brief.NonO157STEC.4.10.pdf>.
46. Hermos CR, Janineh M, Han LL, McAdam AJ. 2011 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in children: diagnosis and clinical manifestations of O157:H7 and non-O157:H7 infection. *J Clin Microbiol.* 2011;49:955–9.
47. Mora A, Blanco JE, Blanco M, Alonso MP, Dahbi G, Echeita A, et al. Antimicrobial resistance of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* O157:H7 and non-O157 strains isolated from humans, cattle, sheep and food in Spain. *Res Microbiol.* 2005;156:793–806.
48. Bugarel M, Beutin L, Martin A, Gill A, Fach P. Micro-array for the identification of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) seropathotypes associated with Hemorrhagic Colitis and Hemolytic Uremic Syndrome in humans. *Int J Food Microbiol.* 2010;142:318–29.
49. Mora A, Blanco M, Blanco JE, Alonso MP, Dahbi G, Thomson-Carter F, et al. Phage types and genotypes of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 isolates from humans and animals in Spain: identification and characterization of two predominating phage types (PT2 and PT8). *J Clin Microbiol.* 2004;42:4007–15.
50. Torres AG, Blanco M, Valenzuela P, Slater TM, Patel SD, Dahbi G, et al. Genes related to long polar fimbriae of pathogenic *Escherichia coli* strains as reliable markers to identify virulent isolates. *J Clin Microbiol.* 2009;47:2442–51.
51. Blanco J, González EA, Blanco M, Garabal JL, Alonso MP, Fernández S, et al. Enterotoxigenic *Escherichia coli* associated with infant diarrhoea in Galicia, north-western Spain. *J Med Microbiol.* 1991;35:162–7.
52. Del Canto F, Valenzuela P, Cantero L, Bronstein J, Blanco JE, Blanco J, et al. Distribution of Classical and Non-Classical Virulence Genes in Enterotoxigenic *Escherichia coli* Isolated from Chilean Children and tDNA Screening for Putative Insertion Sites for Genomic Islands. *J Clin Microbiol.* 2011;49:3198–203.