

# **Trabajo Fin de Grado en Nutrición Humana y Dietética.**

Identificación y caracterización de  
*E. coli* aisladas de conejos con  
síntomatología diarreica.



---

**Universidad de Valladolid**

**Autor: Dña. Silvia Suárez Martín**

**Tutor: Dña. Irma Caro Canales**

Facultad de Medicina

Universidad de Valladolid

Curso 2019-2020

## RESUMEN

Existe un importante número de casos y brotes asociados al consumo de alimentos contaminados por cepas patógenas de *E. coli* que causan enfermedades como gastroenteritis, síndrome urémico hemolítico, trombocitopenia e incluso fallo renal. Los conejos actúan como vectores en la transmisión de la infección causada por estas bacterias, debido a que su carne se puede contaminar con cepas de *E. coli* patógenas. En el presente trabajo se lleva a cabo la identificación de 90 aislamientos de la zona colorrectal de conejos de granjas con sintomatología diarreica mediante espectrometría de masas MALDI TOF. Así mismo, se estudió la presencia de factores de virulencia en 30 de las cepas de *E. coli* aisladas, según lo indicado anteriormente, mediante una PCR multiplex para los genes *eaeA*, *Stx1* y *Stx2*. *Escherichia coli* fue la especie que se aisló con mayor frecuencia con un 84%, seguida de *Enterococcus faecalis* con un 7% de los aislamientos y de *Morganella morganii* con un 6% de los aislamientos. Respecto a las cepas de *E. coli* estudiadas, ninguna de ellas fue positiva para los genes *Stx1* y *Stx2* y únicamente el 3,3% fueron positivas al gen *eaeA*.

## PALABRAS CLAVE

*E. coli*, MALDI TOF, PCR, conejos, sintomatología diarreica, gen *eaeA*.

## ABSTRACT

Pathogenic of *E. coli* has been associated with gastroenteritis, hemolytic uremic syndrome, thrombocytopenia and kidney failure. Rabbits have been considered as a vector of this borne disease, especially their meat that could be contaminated with this pathogen. The aim of this study has been to identify and characterize 90 isolates of *E. coli* bacteria from the colon of rabbits with diarrheal disease. The identification of the isolates was carried out by mass spectrometry MALDI TOF, and the virulence factors of 30 isolates of *E. coli* were studied by a PCR multiplex (genes *eaeA*, *Stx1* y *Stx2*). *Escherichia coli* was the most frequent species identified (84%), followed by *Enterococcus faecalis* (7%) and *Morganella morganii* (6%). None of the *E. coli* studied was positive to the *Stx1* y *Stx2* genes, and only the 3,3% were positive to the *eaeA* gen.

## KEYWORDS

*E. coli*, MALDI TOF, PCR, rabbits, diarrhoeic symptomatology, gen *eaeA*

# ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1	Justificación.....	1
1.2	Características generales de <i>E. coli</i> .....	1
1.3	Cepas de <i>E. coli</i> patógenas.....	2
1.3.1	<i>E. coli</i> enteropatógena (EPEC).....	3
1.3.2	<i>E. coli</i> enterotoxigénica (ETEC).....	5
1.3.3	<i>E. coli</i> enteroinvasiva (EIEC).....	7
1.3.4	<i>E. coli</i> enterohemorrágica (EHEC).....	8
1.3.5	<i>E. coli</i> enteroagregativa (EAaggEC).....	10
1.3.6	<i>E. coli</i> con adherencia difusa (DAEC).....	11
1.4	Dosis infectiva de <i>E. coli</i> patógenas.....	12
1.5	Importancia de la presencia de <i>E. coli</i> en alimentos.....	13
1.6	Brotos de <i>E. coli</i> en alimentos.....	14
1.7	Factores de virulencia de <i>E. coli</i> .....	16
1.8	Metodología para la identificación de <i>E. coli</i> .....	19
1.8.1	Métodos fenotípicos.....	19
1.8.2	Métodos moleculares.....	20
1.8.3	Métodos proteómicos.....	21
2	OBJETIVOS.....	21
2.1	Objetivo general.....	21
2.2	Objetivos específicos:.....	21
3	MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
3.1	Toma de muestras.....	22
3.2	Identificación bacteriana mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF).....	22
3.3	Detección de factores patógenos en <i>Escherichia coli</i> a través de PCR (reacción en cadena de polimerasa).....	23
3.3.1	Extracción del DNA.....	23
3.3.2	Selección de genes “diana” y cebadores.....	24

3.3.3	Mezcla de la reacción (tener en cuenta los controles) .....	24
3.3.4	Controles .....	25
3.3.5	Amplificación de fragmentos del DNA.....	25
3.3.6	Ajustes previos a las condiciones de la PCR final.....	26
3.3.7	Análisis de los productos de la reacción de PCR.....	27
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	27
5	CONCLUSIONES.....	33
6	BIBLIOGRAFÍA.....	34

# 1 INTRODUCCIÓN

## 1.1 Justificación

En la actualidad existe un amplio número de casos y brotes asociados al consumo de alimentos contaminados por cepas de *E. coli* que presentan factores de virulencia, provocando una amplia variedad de infecciones asociadas a enfermedad en humanos. En respuesta a ello, surgen numerosas ramas de investigación con el objetivo de buscar medidas de prevención a lo largo de toda la cadena alimentaria que permitan disminuir el número de casos y brotes alimentarios asociados a estas cepas bacterianas.

Por otro lado, es necesaria la evaluación de la efectividad y rapidez de las nuevas técnicas aplicadas al estudio de la microbiología de los alimentos. En la actualidad, el método espectrometría de masas MALDI-TOF permite una identificación microbiana con una buena relación coste-efectividad. Así mismo, la PCR (Reacción en Cadena de Polimerasa) es un técnica altamente específica y sensible para la detección de factores de virulencia de de *E. coli* en un corto periodo de tiempo.

Así mismo, los conejos se caracterizan por ser un importante vehículo de transmisión de determinadas cepas patógenas de *E. coli*; pudiendo ser su carne uno de los principales portadores de *E. coli* enterohemorrágica y *E. coli* enteropatógena, causantes de enfermedades como gastroenteritis, septicemias y síndrome urémico hemolítico. Según la OMS, estas bacterias han causado más de un millón de enfermedades en el 2017.

Finalmente, a nivel personal la elección del tema se encontró motivada por la posibilidad de ampliar los conocimientos sobre la microbiología de los alimentos, así como, en la aplicación de los métodos más utilizados en la actualidad para la identificación bacteriana y detección de factores patógenos.

## 1.2 Características generales de *E. coli*

*Escherichia coli* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* y se caracteriza por ser una de las especies más importante y frecuente del género *Escherichia* (1). Es un bacilo gram negativo, anaerobio facultativo, mesófilo, ubicuo, móvil o inmóvil y no forma esporas. En cuanto a sus características bioquímicas: fermenta la glucosa y la lactosa, reduce los nitratos, produce indol a partir de triptófano y es catalasa-positivo y

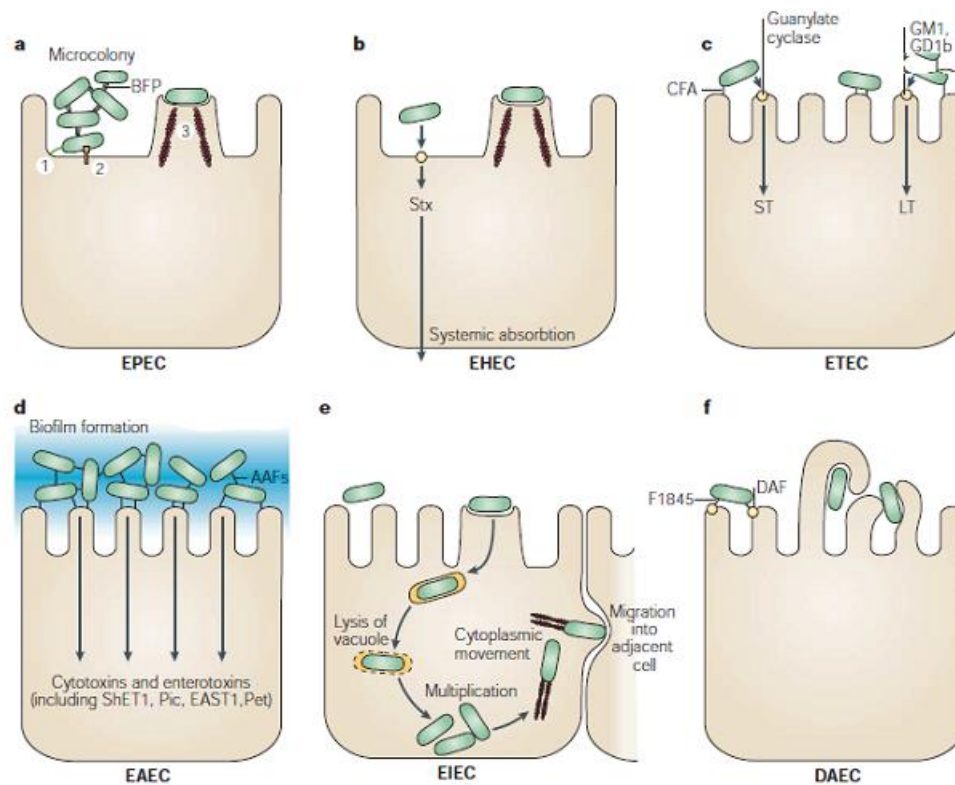
oxidasa-negativo (1)(2). Es una bacteria que puede crecer a pH entre 3-4, pero no inferior a 2; a una  $a_w$  de 0,95 y a temperatura aproximada de 60°C, pero no inferior a 72°C (2). Este microorganismo coloniza el tracto intestinal de los humanos y animales de sangre caliente en las primeras horas de vida y pasa a formar parte de su microbiota normal. Normalmente, *E. coli* y sus huéspedes coexisten sin provocar enfermedad y con beneficio mutuo durante décadas (3).

Sin embargo, existen determinadas cepas patógenas que debido a la adquisición de factores de virulencia, tienen la capacidad de provocar una amplia variedad de infecciones. Estas cepas se asocian a múltiples enfermedades de tipo entérico (gastroenteritis, diarreas, disentería, colitis hemorrágica, síndrome urémico hemolítico, edemas) y extraentérico (infecciones del tracto urinario, septicemias, meningitis, infecciones respiratorias o de heridas, peritonitis, mastitis) (1)(4)(3).

### **1.3 Cepas de *E. coli* patógenas**

En base al sistema de clasificación serológica propuesto por Kauffmann en 1947 existen tres tipos de antígenos de superficie (O: somático; H: flagelar; K: capsular) *E. coli* presenta 176 antígenos somáticos (O), 112 flagelares (H) y 60 capsulares (K). Cada antígeno "O" define un serogrupo y cada combinación específica de antígenos "O" y "H" (O: H) define el serotipo de cada aislamiento. Ambos sirven como marcadores cromosómicos de fácil identificación que se correlacionan con clones virulentos específicos y en ocasiones pueden ser asociados con cuadros clínicos particulares (4)(3)(5).

A partir de los mecanismos de patogenicidad, los factores de virulencia y cuadros clínicos, las cepas de *E. coli* causantes de infecciones gastrointestinales se clasifican en seis grupos (ver Figura 1): *E. coli* enteropatógena (EPEC); *E. coli* enterotoxigénica (ETEC); *E. coli* enteroinvasiva (EIEC); *E. coli* enterohemorrágica, también conocida como productora de verotoxinas o toxinas "Shiga" (EHEC/VTEC/STEC); *E. coli* enteroagregativa (EAEC) y *E. coli* con adherencia difusa (DAEC) (3)(5)(6).



**Figura 1.** Esquema patogénico de las cepas de *E. coli* patógeno-diarreicas (3).

Los esquemas reflejan las formas de interacción de las cepas patógenas de *E. coli* con las células eucariotas, obtenidas a partir de estudios “in vitro”, aunque no podrían reflejar completamente los fenómenos que ocurren en humanos infectados. Encontramos: a) EPEC lesión de adhesión y eliminación (A/E) en intestino delgado: (1) adhesión inicial, (2) traslocación de proteínas por secreción tipo III, (3) formación de pedestales debajo de la fijación bacteriana, resultado del reordenamiento de los elementos del citoesqueleto y acumulación de actina polimerizada junto con otras enzimas; b) EHEC lesión de adhesión y eliminación en el colon, junto con la secreción de la toxina Shiga (*Stx*) que da lugar al síndrome urémico hemolítico y/o a la púrpura trombocitopénica trombótica; c) ETEC se adhiere a los enterocitos del intestino delgado e induce a diarrea acuosa por secreción de enterotoxinas termolábiles (LT) y/o termoestables (ST); d) EAEC se adhiere a los epitelios del intestino delgado y grueso formando una biopelícula gruesa y elabora enterotoxinas secretoras y citotoxinas; e) EIEC invade las células del epitelio del colon, lisa el fagosoma y se mueve a través de la célula nucleando microfilamentos de actina. La bacteria podría desplazarse lateralmente por el epitelio a través de diseminación directa de célula a célula; f) DAEC provoca el crecimiento de largas proyecciones celulares sobre los enterocitos del intestino delgado, que envuelven a la bacteria. AAF: fimbrias de adherencia agregativa; BFP: pilis formadores de haces; CFA: antígeno del factor de colonización, DAF: factor de aceleración de la descomposición; LT: enterotoxina termolábil, ST: enterotoxina termolábil, ShET1: enterotoxina *Shigella* (3).

### 1.3.1 *E. coli* enteropatogénica (EPEC)

*E. coli* enteropatogénica fue el primer patógeno o patotipo de *E. coli* identificado serológicamente y se asoció con grandes brotes diarreicos en niños menores de 2 años en las décadas de 1940 y 1950, siendo en la actualidad una de las principales causas de diarrea infantil en países en vías de desarrollo (3)(7).



El mecanismo de acción patógeno de EPEC es una lesión de adhesión y eliminación (A/E) de la mucosa intestinal, que puede ser observada en muestras de biopsia intestinal de pacientes o animales infectados y reproducida en cultivos celulares (5). La lesión se inicia con un contacto íntimo de la bacteria con la membrana plasmática apical, provocando una destrucción localizada del borde del cepillo intestinal y una posterior distorsión y pérdida de la capacidad de absorción del enterocito, dando lugar a un acúmulo de solutos en el lumen intestinal que conduce a la diarrea acuosa característica de esta enfermedad (5)(8). Este contacto tiene como resultado un reordenamiento de los elementos del citoesqueleto y acumulación de actina polimerizada junto con otras enzimas como la talina, cadena ligera de ezrina y miosina, que da lugar a la formación de estructuras en forma de “pedestal” debajo de los sitios de fijación bacteriana (5)(9). La formación de la lesión A/E es un proceso dinámico dividido en tres etapas principales de patogénesis: (I) adherencia localizada inicial, (II) transducción de señales y (III) adherencia íntima (10); durante el cual se ha comprobado que estos pedestales pueden doblarse y ondularse y que las bacterias pueden desplazarse por la superficie de la célula huésped (8). La primera etapa de adherencia de las bacterias a las microvellosidades esta mediada por pilis o fimbrias rizadas denominadas BFP (*bundle-forming-pilis*) cuya información genética se encuentra codificada en el plásmido EAF (*EPEC adherence factor*) de 50-70 MDa y otros genes cromosomales necesarios para completar la adherencia localizada inicial en forma de microcolonias (3)(11). Posteriormente, en la segunda etapa la actividad de transducción es codificada por la isla de patogenicidad “locus de eliminación de los enterocitos” (LEE: *locus of enterocyte effacement*) de 35 kb. Este LEE codifica la formación de una proteína de la parte exterior de la membrana de 94 kDa llamada intimina, la cual interviene en la adhesión de la EPEC a las células epiteliales. La intimina no sólo funciona como un ligando para la adhesión a las células epiteliales, sino que también estimula la respuesta inmune de la mucosa T<sub>H1</sub> y la hiperplasia de la cripta intestinal. Así mismo, más de 41 marcos de lectura abierta en el corazón de la isla de patogenicidad del LEE codifican el sistema de secreción Tipo III (T3SS: *type III secretion system*), las proteínas efectoras hacia el interior de la célula hospedadora (Esp), y los chaperones (3)(5)(12). En la última etapa, una de las proteínas efectoras, conocida como receptor de intimina translocado (Tir), se inserta en la membrana de la célula del epitelio y actúa como receptor para la intimina codificada por el gen *eaeA*; determinando la posterior acumulación en forma de pedestal de la actina polimerizada junto con numerosas proteínas citoesqueléticas que permiten la fijación en la parte exterior de las células; generando daño en las microvellosidades, pérdida de la integridad de la superficie y muerte celular (3)(10)(11).

Las cepas de EPEC se dividen en típicas y atípicas, en función de si presentan el gen *eaeA* que codifica para la producción de intimina y el factor de adherencia (EAF) (típicas) o sólo presentan el gen *eaeA* que codifica para la intimina (atípicas). Si EPEC posee el plásmido denominado EAF (EPEC factor de adhesión) que codifican para la formación de pilis tipo IV formadores de haces (BFP), estos intervienen en la adherencia entre bacterias y posibilitan la adherencia a las células epiteliales, facilitando el proceso de lesión A/E (5)(9).

Al igual que otras cepas de *E. coli*, la forma de transmisión de EPEC es fecal-oral por contaminación de alimentos, manos, fórmulas de destete o fómites que sirven como vehículos de transmisión. Los reservorios de EPEC pueden ser niños y/o adultos sintomáticos o asintomáticos y puede ocasionar brotes o casos aislados de diarrea, principalmente en niños menores de dos años (3)(5).

Finalmente, la enfermedad que provoca se caracteriza por una diarrea acuosa, resultado de múltiples mecanismos entre los que se incluyen: secreción de iones activos, aumento de la permeabilidad intestinal, inflamación intestinal y pérdida de absorción; resultado del borramiento de las microvellosidades. La diarrea puede ser grave, prolongarse en el tiempo e ir acompañada de fiebre y vómitos (3)(5).

### **1.3.2 *E. coli* enterotoxigénica (ETEC)**

*E. coli* enterotoxigénica provoca diarrea acuosa y puede cursar desde una enfermedad poco grave a una grave. Es causa importante de diarrea infantil en países en vías de desarrollo, especialmente en los meses cálidos y húmedos de zonas nativas americanas; y principal causa de diarrea del viajero de norteamericanos y europeos que visitan zonas endémicas de la enfermedad (3)(5)(13).

Las cepas de ETEC pueden expresar una de las dos toxinas, enterotoxinas termolábiles (LT: *heat-labile enterotoxins*) o enterotoxinas termoestables (ST: *heat-stable enterotoxins*) o ambas toxinas (LT + ST) (3)(5). Las toxinas enterotermoestables son toxinas de pequeño tamaño que incluyen dos clases de toxina que no se encuentran relacionadas entre ellas (STa y STb), difieren tanto en su estructura como en su mecanismo de acción patógeno. Únicamente la enterotoxina STa está asociada con enfermedades en humanos y en animales; mientras que STb está asociada principal con diarrea en lechones. Respecto a las toxinas termolábiles, estas tienen una estructura y función similar a la enterotoxina cólera (CT) que expresa *Vibrio cholerae*. La enterotoxina LT-I se asocia con cepas aisladas en humanos, mientras que LT-II se asocia sólo a enfermedad en animales (5)(14).

El mecanismo de acción patógeno de ETEC en humanos se caracteriza por una colonización de la mucosa del intestino delgado y posterior síntesis de enterotoxinas (LT/ST) que incrementan la secreción intestinal. La colonización se encuentra mediada por uno o varios factores de colonización fimbriales proteínicos (FFC): antígeno del factor de colonización (CFA), antígeno coli de superficie (CS) y el factor de colonización putativo (PCF). La toxina LT está formada por una subunidad A y cinco subunidades B. En primer lugar, se une a través de las subunidades B a los receptores (gangliósidos GM<sub>1</sub>) y otras glucoproteínas que se encuentran en la superficie del borde del cepillo y posteriormente penetra en los enterocitos por endocitosis. La LT llega a la membrana basolateral y a través de su subunidad A, que tiene actividad enzimática, activa la adenil-ciclase provocando un aumento intracelular de monofosfato de adenosina cíclico (AMPc), una activación de cinasas dependientes del AMPc y una eventual activación del principal canal de cloruro (CTFR) de las células epiteliales. El resultado es el incremento de la secreción de cloro de las células de la cripta secretora y la inhibición de la absorción de cloruro de sodio (CINa), que da lugar a la diarrea osmótica característica de la enfermedad. La toxina STa es un péptido de pequeño tamaño y monomérica que se une al receptor transmembrana de la guanilato-ciclase y provoca un aumento intracelular de guanosina monofosfato cíclico (GMPc), que a su vez activa las cinasas dependientes del GMPc y/o del AMPc dando lugar a una posterior hipersecreción de líquidos (3)(13)(15).

La forma de transmisión de ETEC es fecal-oral, por consumo de alimentos y agua contaminados por heces. La dosis infectiva para producir la enfermedad es alta, siendo de 10<sup>6</sup>-10<sup>10</sup> UFC (Unidades Formadoras de Colonias) (13)(15).

Como ya se mencionó anteriormente, ETEC produce una diarrea acuosa como enfermedad principal, que persiste aproximadamente de 3-5 días tras un periodo de incubación de 1-2 días y es autolimitada (13). El cuadro clínico es muy similar al causado por el *Vibrio cholerae* pero más leve, especialmente en adultos. Los síntomas se caracterizan por la aparición repentina de heces acuosas (sin sangre, sin moco, sin pus) que en algunos casos puede ir acompañada de náuseas o vómitos y conducen a una deshidratación por pérdida de líquidos y electrolitos en las heces (5)(15). Esta deshidratación puede verse reflejada en: boca seca, letargo, disminución de la turgencia de la piel, hipotensión arterial, calambres musculares y en algunas ocasiones, en las formas más graves, shock hipovolémico (13).

### 1.3.3 *E. coli* enteroinvasiva (EIEC)

En 1971, DuPont y colaboradores descubrieron que determinadas cepas de *E. coli* causaban colitis inflamatoria invasiva y ocasionalmente disentérica en muchos casos de diarrea acuosa cuando se realizó en estudios con personas voluntarias. Además, este microorganismo muestra características bioquímicas, genéticas y patógenas similares a *Shigella spp*, aunque con una virulencia más leve y una dosis infecciosa más alta (5)(16).

El mecanismo de patogenicidad actual de EIEC comprende las fases: (I) penetración en las células epiteliales, (II) lisis de la vacuola endocítica, (III) multiplicación intracelular, (IV) movimiento direccional a través del citoplasma y (V) extensión en células epiteliales adyacentes. Si el proceso infeccioso es severo, esta secuencia de eventos puede provocar la ulceración colónica característica de una fuerte reacción inflamatoria (3)(5). Además, tiene la capacidad de elaborar una o más enterotoxinas secretoras que pueden desempeñar un papel importante en la enfermedad diarreica (5). Los genes necesarios para llevar a cabo este complejo proceso patogénico se encuentran en el plásmido pInV de 140 MDa, que codifica para un sistema de secreción de tipo III necesario para la producción de múltiples proteínas de membrana, como las IpaA, IpaB, IpaC e IpgD, implicadas en: la señalización epitelial, reordenamientos citoesqueléticos, captación celular y lisis de la vacuola endocítica, entre otras acciones (3)(16). Aunque el sistema de secreción tipo III es esencial para la invasión de la célula, se han descrito otros factores de virulencia, como la proteasa serina que codifica para el plásmido SepA, el sistema de adquisición de hierro de aerobactina codificado por el cromosoma, así como, otras proteasas secretadas codificadas por los genes presentes en las islas de patogenicidad (3).

Las cepas patogénicas de EIEC están asociadas a serotipos específicos de *E. coli* O: *E. coli* O:O28ac: NM, O29: NM, O112ac: NM, O121: NM, O124: NM, O124: H30, O135: NM, O136: NM, O143: NM, O144: NM, O152: NM, O159: H2, O159: NM, O164: NM, O167: H4, O167: H5, O167: NM y O173: NM(17). La transmisión de estas cepas generalmente se produce en forma de brotes a través de alimentos o aguas contaminadas, aunque también puede llevarse a cabo de persona a persona (5).

Finalmente, la infección que provoca EIEC en la mayoría de los casos se caracteriza por una diarrea acuosa que puede no diferenciarse de la que produce ETEC. Sólo una minoría de pacientes presenta diarrea disentérica, que se manifiesta con la presencia de sangre, moco y leucocitos en las heces, tenesmo, fiebre, malestar y calambres (5)(16).

### 1.3.4 *E. coli* enterohemorrágica (EHEC)

En 1982, *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) fue reconocida por primera vez como causa de dos brotes enfermedad gastrointestinal humana en Oregón y Michigan, aparentemente transmitida por carne poco cocinada (18). En las últimas décadas, *E. coli* enterohemorrágica es la más relacionada con la morbilidad y mortalidad en humanos asociadas a infecciones causadas por brotes alimentarios de forma directa e indirectamente, siendo causante de importantes pérdidas económicas en la industria alimentaria (19). Existe un amplio número de serotipos atribuidos a cepas de EHEC, siendo el serotipo *E. coli* O157:H7 uno de los más importantes patógenos transmitidos por alimentos por ser causante de enfermedades potencialmente mortales como la colitis hemorrágica que puede derivar en síndrome urémico hemolítico (SUH), siendo especialmente vulnerables niños de corta edad, ancianos e inmunodeprimidos (20)(21).

El mecanismo de acción patógeno de EHEC se basa en su capacidad de producir una o más toxinas de la familia Shiga (*Stx*) o verotoxinas (VT) (5), potentes citotoxinas que se encuentran relacionadas con la toxina producida por *Shigella dysenteriae* tipo I (22). Estas verotoxinas están constituidas por cinco subunidades B idénticas de 7,7 kDa que intervienen en la unión de las holotoxinas a los receptores celulares glucolípidos específicos (Gb3), que se encuentran en la superficie de las células diana; y una subunidad enzimática A de 30 kDa con actividad específica RNA N-glucosidasa que le permite dividir el ARN ribosomal e inhibir la síntesis proteica, dando lugar a la muerte celular (5)(10). Dentro de la familia *Stx* se distinguen dos principales subgrupos: *Stx*<sub>1</sub>/*VT*<sub>1</sub> y *Stx*<sub>2</sub>/*VT*<sub>2</sub>, codificadas respectivamente por los genes *Stx*<sub>1</sub> y *Stx*<sub>2</sub> que comparten aproximadamente un 55% de homología en aminoácidos (3), pero inmunológicamente distintas. Las *Stxs* se producen en el colon atraviesan el epitelio intestinal, viajan a través de la circulación sanguínea pudiendo ir unidas a leucocitos polimorfonucleares humanos (PMNs) (23)(24). Posteriormente, llegan a las células diana expresan el receptor Gb3, sobre todo a nivel renal, provocando el daño de las células endoteliales y oclusión de la microvasculatura a través de una combinación de toxicidad directa e inducción de la producción local de citocinas proinflamatorias, especialmente TNF $\alpha$  y IL, que da lugar a una inflamación de los órganos afectados. Este daño renal puede provocar el desarrollo de Síndrome Urémico Hemolítico (SUH), que se caracteriza por una anemia hemolítica, trombocitopenia e insuficiencia o fallo renal agudo; proceso regulado por la familia Bcl-2 (proteínas pro-apoptóticas formadoras de poros) (3)(23).

Además de producir verotoxinas, determinadas cepas de EHEC pueden presentar otros mecanismos patógenos, como la lesión de adhesión y eliminación (A/E) mediado por el gen *eaeA* u otros factores de virulencia como el gen *ehxA*, que incrementan su poder patógeno (5). El gen cromosomal *eaeA* codifica para la producción de intimina, proteína de membrana externa de 94 kDa que facilita la unión de las cepas bacterianas a las células huésped (25). Mientras que, el gen *ehxA* se encuentra en el plásmido pO157 y codifica para la producción de una hemolisina que se encuentra dentro del grupo de toxinas RTX (26), estas citolisinas tienen la capacidad de causar enfermedades extraintestinales y son activas en diferentes células, como linfocitos, granulocitos, eritrocitos y células tubulares renales (19).

Las de cepas de EHEC se pueden clasificar en típicas y atípicas, en función de si presentan el plásmido de 60 MDa y producen la lesión A/E (típicas) o no producen la lesión A/E pero pueden presentar o no el plásmido de 60 MDa (atípicas) (5). Y en función del serotipo en *E. coli* O157:H7, sorbitol-negativo y  $\beta$ -glucuronidasa-negativo y *E. coli* no O157:H7, sorbitol-positivo y  $\beta$ -glucuronidasa-positivo (27)(28).

La forma de transmisión de EHEC puede ser fecal-oral, por consumo de alimentos y agua contaminados por heces o por transmisión de persona a persona (5). El reservorio de EHEC se encuentra en el tracto intestinal bovino y la mayoría de los casos están asociados a la ingestión de carne y derivados, así como el consumo de leche sin pasteurizar (3). Sin embargo, existe una amplia variedad de alimentos asociados con la enfermedad, incluyendo la carne de cerdo, ave, oveja y conejo (29), así como, verduras crudas, como la lechuga o rábanos (5). Además, también están documentados brotes recientes asociados al consumo de mayonesa (29) y jugo de manzana sin pasteurizar (30).

Finalmente, en la mayoría de los casos las cepas de EHEC provocan una enfermedad que suele iniciarse con diarrea no sanguinolenta precedida de dolor abdominal y una fiebre de corta duración; todo ello puede ir acompañado de vómito. Al cabo de varios días, la diarrea se vuelve sanguinolenta y el dolor abdominal se intensifica. En la mayoría de los casos, el cuadro clínico se resuelve al cabo de 4-10 días sin secuelas aparentes. Sin embargo, en aproximadamente un 10% de pacientes (edad infantil, ancianos e inmunodeprimidos) la enfermedad progresa a síndrome urémico hemolítico, caracterizado por anemia hemolítica, trombocitopenia e insuficiencia renal aguda, y cuyas manifestaciones clínicas iniciales incluyen oliguria o anuria, edema, palidez y, en algunas ocasiones, convulsiones. La mayor parte estos pacientes se recupera con el apoyo adecuado; sin embargo, un pequeño porcentaje

presentara secuelas graves, como insuficiencia renal potentemente moral, hipertensión arterial o afecciones en el sistema nervioso central. La progresión a SUH es más probable que se produzca en pacientes infectados con cepas de *E. coli* EHEC O157:H7; mientras que las cepas *E. coli* EHEC no-O157:H7 provocan cuadros clínicos menos graves, caracterizados por diarrea acuosa con dolor abdominal y colitis hemorrágica (3)(5)(31).

### 1.3.5 *E. coli* enteroagregativa (EAggEC)

*E. coli* enteroagregativa fue identificada por Nataro et al en 1987 (32) y descrita posteriormente por su capacidad de adherirse a las células HEp-2 y a la superficie de cubreobjetos libre de células HEp-2 a través de un patrón autoagregante inespecífico (AA), en el cual las bacterias se adhieren unas a otras adquiriendo la forma de “ladrillos apilados” (33). Desde su descubrimiento, ha sido asociada a brotes de diarrea acuosa aguda o persistente en niños de países en vías de desarrollo (3), diarrea del viajero, diarrea en adultos con infección por VIH y diarrea endémica en ciudades de EE.UU y en adultos sanos de países desarrollados, de forma variable (34).

El mecanismo de acción patógeno de EAEC se basa en tres etapas: (I) colonización y adherencia de las fimbrias a la mucosa intestinal, (II) aumento de la producción de moco que da lugar a la formación de una capa espesa de biofilms en la superficie de los enterocitos y (III) secreción de toxinas (enterotoxinas y citotoxinas) e inducción de la respuesta inflamatoria, que da lugar al daño celular (3)(5)(35). La adherencia a las células HEp-2 y la hemaglutinación de los eritrocitos humanos se debe a la presencia de una fimbria I de adherencia agregativa (AAF/1), una adhesina fimbrial que es codificada por el gen *aggA* que se encuentra en un plásmido de 60 MDa (5)(36). Sin embargo, no todas las cepas de EAggEC expresan esta adhesina fimbrial y se han descrito otras fimbrias genéticamente y morfológicamente distintas a AAF/I, como por ejemplo las fimbrias AAF/II, que median la adhesión de las bacterias al colon humano (5)(37). Respecto a las toxinas se han descrito varios tipos, dos de ellas están codificadas por el mismo locus cromosómico en cadenas opuestas. El gen más grande codifica a la proteasa autotransportadora Pic, que tiene actividad de mucinasa. Mientras que, la hebra opuesta codifica a la enterotoxina oligomérica *Shigella enterotoxina* 1 (ShET1), cuyo mecanismo de acción todavía no se ha podido comprender, pero podría contribuir a la diarrea acuosa característica de la infección por EAggEC (38). Otras toxinas presentes en la mayoría de las cepas de EAggEC son la enterotoxina termoestable EAST1 y la toxina Pet. La primera toxina se caracteriza

por ser un péptido de bajo peso molecular homólogo a la toxina ETEC STa, que podría contribuir a la diarrea acuosa en cepas positivas para esta toxina (39). La segunda toxina se caracteriza por ser una proteína autotransportadora de alto peso molecular que esta codificada para un plásmido de 65 MDa, con actividad enterotóxica (acortamiento de las vellosidades, alteraciones hemorrágicas y necróticas y ulceración del epitelio superior) y capacidad para provocar cambios en el citoesqueleto (38)(40).

Finalmente, las cepas de EAggEC se caracterizan por causar brotes o casos aislados de diarrea persistente. El cuadro clínico suele presentar diarrea acuosa, secretora y mucoide, que puede ir acompañada en algunas ocasiones de fiebre leve, vómito o sangre (5). En niños puede manifestarse con diarrea acuosa, con moco, sin sangre y puede llegar a requerir de rehidratación intravenosa en sus formas más severas (41).

### **1.3.6 *E. coli* con adherencia difusa (DAEC)**

*E. coli* con adherencia difusa se identifica por tener un patrón de adherencia difusa (DA) a célula HEp-2, en el cual cubren uniformemente toda la superficie celular sin formar microcolonias (42). El grado de implicación de las cepas de DAEC en la diarrea sigue siendo controvertido; hay estudios que encuentran asociación en niños de más de 12 meses de edad, en particular en el noroeste de Brasil (43).

El mecanismo de acción patógeno de DAEC no está claramente demostrado, aunque se sabe que la mayoría de las cepas, como la DEAC C1845, producen F1845, una fimbria de adherencia que permite la adhesión a la superficie de células que expresan sitios de unión específicos (5)(42). Los genes que codifican para la fimbria F1845 pueden encontrarse en un cromosoma o en un plásmido (5). Estas fimbrias pertenecen a la familia de las adhesiones Dr que se unen a células que tienen en su superficie una proteína conocida como DAF, que actúa como receptor para *E. coli* C1845, desencadenando un efecto citopático que da lugar a una señalización de varios eventos que afectan a las funciones de transporte y/o secreción y a la organización de la estructura celular (44). En una minoría de cepas aisladas de DEAC (O126:H27), el fenómeno de adherencia difusa se ha asociado a AIDA-I, una proteína de membrana externa de 100kDa con capacidad de producir la diarrea característica de la infección (45). En los últimos años, se han identificado cepas Afa/Dr DAEAC asociadas con infecciones del tracto urinario (ITU), complicaciones en mujeres embarazadas y diarrea en niños de 18 a 5 años de edad; que poseen islas de



patogenicidad que no se encuentran en las cepas intestinales de la microbiota de niños y adultos (3)(46).

Finalmente, las cepas de DAEC se pueden aislar de personas sanas y que presentan diarrea, siendo de mayor importancia los niños mayores de 1 año hasta los 4-5 años de edad (47). La diarrea se caracteriza por ser acuosa, sin sangre y sin leucocitos (5). El fenómeno, características epidemiológicas y modo de adquisición de la infección aún son indeterminados (43)(47).

#### **1.4 Dosis infectiva de *E. coli* patógenas**

La dosis infectiva de *E. coli* enteropatogénica (EPEC) actualmente es desconocida (48). Aunque se han realizado algunos estudios sobre las dosis infectivas en voluntarios adultos, en los que fue necesaria una dosis entre  $10^8$ - $10^{10}$  UFC (Unidades Formadoras de Colonias) para producir diarrea (5)(48), teniendo en cuenta que previamente se neutralizó el ácido gástrico con bicarbonato (5).

La dosis infectiva de *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), en comparación con otras cepas patógenas de *E. coli*, es relativamente alta; se cree que está entre  $10^6$ - $10^8$  UFC (5)(48). Sin embargo, esta dosis infecciosa se basa en ensayos “in vitro” y puede diferir de la dosis de transmisión de la infección natural (48).

La infección por *E. coli* enteroinvasiva EIEC tiende a ser menos virulenta que la de *Shigella spp*, algunos autores indican que se requiere un mayor número de microorganismos para causar la infección y que es superior a la dosis infectiva ( $10$ - $10^2$  UFC) de *Shigella spp* (5)(48).

*E. coli* enterohemorrágica (EHEC), a diferencia del resto de cepas de *E. coli* patógenas, con una dosis extremadamente baja es capaz de provocar infección (<100 células) (3). Una investigación, determinó que la empanada de carne con el nivel más alto de STEC O157:H7 contenía sólo 675 organismos por gramo y sugirió que la dosis infecciosa de esta bacteria podría ser inferior (48).

*E. coli* enteroagregativa (EAggEC), como patógeno gastrointestinal, ha sido investigado en varios estudios con voluntarios. En estos estudios se observó que determinadas cepas de EAggEC causaban diarrea sólo en una parte de los voluntarios, siendo la dosis infectiva entre  $10^8$ - $10^{10}$  UFC/ml (49).

En la actualidad, todavía no se ha desarrollado un método universal para la detección de cepas de *E. coli* de agregación difusa (DAEC) responsables de diarrea,

en el entorno clínico. Por tanto, las características de su epidemiología siguen siendo poco claras y se necesita investigar más sobre su transmisión y la dosis infectiva que causa infección (48).

### **1.5 Importancia de la presencia de *E. coli* en alimentos**

La epidemiología de las cepas patógenas de *E. coli* transmitidas a través de los alimentos es variable. En países en vías de desarrollo son frecuentes las cepas ETEC, EIEC y EPEC. Mientras que, en los países desarrollados la cepa más común ha sido EHEC (5)(50).

Las cepas patógenas de *E. coli* son excretadas a través de las heces de huéspedes enfermos o sanos. Los rumiantes, en particular el ganado vacuno, son considerados como el principal reservorio de EHEC O157:H7. Las heces portadoras de esta cepa patógena pueden contaminar la carne durante el sacrificio en el matadero, ser arrastradas hasta aguas de bebida o depositarse en frutas y verduras por el uso de abonos orgánicos o agua de riego contaminada con aguas residuales. Además, algunos animales como insectos, aves, roedores y otros animales silvestres, pueden ser vectores y transportar las bacterias desde las heces al agua de bebida y a los alimentos (51). Los seres humanos se pueden contaminar con EHEC O157:H7 a través de contacto directo con una persona infectada o un animal portador, o indirectamente a través del medio ambiente, agua o alimentos contaminados con heces portadoras de esta cepa patógena (48).

Las cepas de toxina Shiga (STEC) se caracterizan por tolerar temperaturas mínimas de 7-10°C y máximas de 50°C, siendo su temperatura óptima de crecimiento de 37°C. Además, son consideradas las cepas de *E. coli* más ácido-resistentes, capaces de sobrevivir a un pH inferior a 4,4 y crecer en alimentos con una actividad de agua de 0,95 (52). Estas características permiten a EHEC O157:H7 crecer fácilmente en productos cárnicos a una temperatura de conservación superior a 7°C; un ejemplo de ello es la carne de conejo, que presenta un pH de 6 y una  $a_w$  de 0,98 (53).

Los tratamientos bactericidas son considerados el único método eficaz para la eliminación de STEC de los alimentos, como el calentamiento (cocción o pasteurización) o la irradiación (54). Sin embargo, la resistencia al calor de *E. coli* depende de la matriz alimentaria; por ello, los tratamientos térmicos considerados letales para esta bacteria pueden resultar no ser suficientes para eliminar determinadas cepas patógenas, como *E. coli* O157:H7. La resistencia extrema al calor de *E. coli* es conferida por una isla genómica de 14 kbp (LHR) que codifica 16 genes;

de los cuales, 6 genes son exclusivos de cepas de *E. coli* resistentes al calor. Se ha visto que la adquisición de LHR aumenta la supervivencia en más de 7 log (UFC/mL), después de la exposición a 60°C durante 5 minutos. Así mismo, esta resistencia al calor aumenta en alimentos con baja actividad de agua y elevada acumulación de solutos; como por ejemplo la carne picada con elevadas concentraciones de NaCl (55).

Parece evidente que las recomendaciones actuales para la eliminación de patógenos pueden ser no suficientes para controlar determinadas cepas de *E. coli* altamente resistentes al calor. Es necesario desarrollar un método que asegure la inactivación de las cepas más resistentes al calor (55).

## **1.6 Brotes de *E. coli* en alimentos**

Las cepas de *E. coli* productoras de toxinas Shiga (STEC) son las que producen un mayor número de brotes en el mundo y son transmitidas por alimentos (56). Recientemente, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó que estas cepas bacterianas causaron en 2010 más de 1 millón de enfermedades transmitidas por los alimentos, más de 100 muertes y casi 13.000 años de vida ajustados a discapacidad (AVAD) (57).

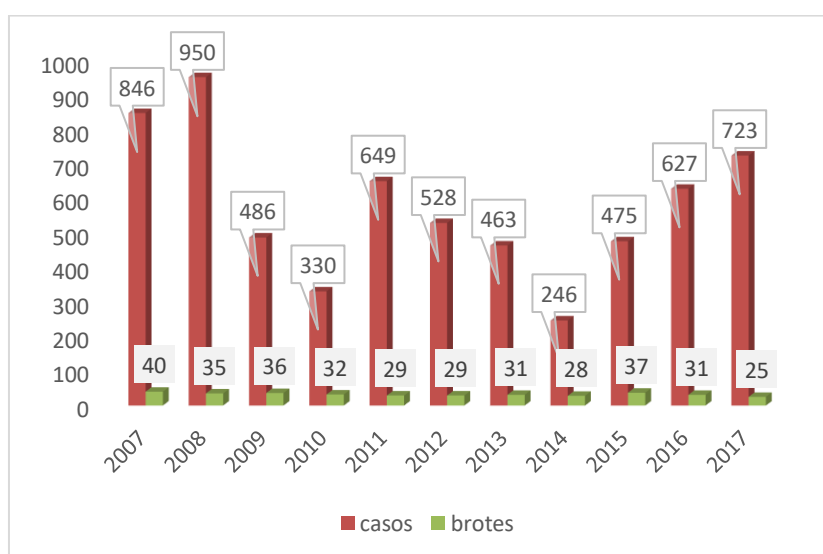
Una reciente revisión bibliográfica recoge un total de 957 brotes de STEC de 27 países según las regiones de la Organización Mundial de la Salud: las Américas (AMR), Europa (EUR) y el Pacífico occidental (WPR), en el período comprendido entre 1998 y 2017. Los brotes más antiguos fueron recogidos en EEUU del 1998 al 2015; mientras que los datos de los brotes recogidos de los países restantes ocurrieron entre 2010 y 2017. El estudio dividió los alimentos en simples, cuando pertenecían a una sola categoría, o complejos, cuando los ingredientes pertenecían a varias categorías. Los resultados mostraron que la carne de vacuno, los productos agrícolas y los productos lácteos fueron las fuentes con mayor probabilidad de ser la causa de un brote de STEC causado por un alimento complejo y que estos alimentos variaban de categoría entre las regiones (58).

En otro estudio realizado en EEUU, se reportó un total de 350 brotes y 8.598 casos de infección por *E. coli* O157 en 49 estados en el período de 1982 a 2002. Entre los casos, hubo 1.493 hospitalizaciones, 354 casos de SUH y 40 muertes. La mayoría de los brotes ocurrieron de mayo a noviembre, y fueron disminuyendo en el período de 1982 a 2002. La principal causa de los brotes fue la transmisión por alimentos en comunidades, seguido de restaurantes y escuelas. Los alimentos implicados con

mayor importancia fueron la carne picada de vacuno, siendo el principal vehículo de transmisión de EHEC O157 y productos agrícolas, como lechuga, brotes, repollo, o zumo de manzana. Estos últimos mostraron un aumento del número de infecciones en los últimos años (59).

Durante el período 2013-2017, los Estados miembros de la Unión Europea (UE) notificaron un total de 30.400 casos de infección en humanos por STEC. En 2017, se comunicaron 6.073 casos confirmados de infecciones por STEC en UE. La tasa de notificación fue de 1,66 casos por 100.000 habitantes; lo que representa una disminución del 6,2% en comparación con 2016, que era de 1,77 casos por cada 100.000 habitantes. Como en años anteriores, el serogrupo O157 fue al que más casos de infección por STEC se le atribuyeron y la carne de vacuno el principal vehículo de transmisión a través de alimentos (60).

En la Figura 2 se recoge la evolución de los casos asociados a las *E. coli* patógenas obtenidos del Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) de EEUU desde el año 2007 hasta el año 2017, se puede observar una disminución del número de brotes y casos asociados a *E. coli* patógena transmitida por alimentos a partir del año 2008. *E. coli* verotoxigénica fue la responsable de la mayor parte de estos casos de infección, seguida por *E. coli* enterotoxigénica y *E. coli* enteroagregativa, en menor proporción. Según la información recogida de la CDC, el principal vehículo de transmisión de estas bacterias fue el consumo de carne picada, seguida por el consumo de leche y productos lácteos no pasteurizados y productos vegetales contaminados, como la lechuga, el repollo o las espinacas (61).



**Figura 2:** Número de brotes y casos de *E. coli* en alimentos desde el 2007 a 2017, en EEUU. Elaboración propia.

En la Figura 3 se pueden observar el número de casos y brotes de *E. coli* verotoxigénica producidos en España desde el año 2010 hasta el 2016, estos datos fueron obtenidos de la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica (RENAVE). Al contrario de lo observado en EEUU, en España se observa un crecimiento del número de casos a partir del 2013; posiblemente debido al cambio de criterio en la notificación de *E. coli* verotoxigénica respecto a los anteriores años, en los cuales no era obligatoria su notificación. Los vehículos de transmisión no fueron notificados o escasamente notificados por la RENAVE, por lo que no se ha podido establecer cuál es el principal vehículo de transmisión (62).



**Figura 3:** Brotes de *E. coli* verotoxigénica en alimentos, en España. Elaboración propia.

### **1.7 Factores de virulencia de *E. coli***

*Escherichia coli* presenta una gran cantidad factores de virulencia que se han dividido en diferentes categorías, como la adhesión, la aptitud para la colonización y los efectos tóxicos de las toxinas en las Tablas 1 y 2. Las cepas más patógenas de *E. coli* presentan principalmente entre otros factores de virulencia: las verotoxinas, el gen *eaeA* y la enterolixina (3). Mientras que, las cepas de *E. coli* enteropatógena presentes en conejos con sintomatología diarreaica, generalmente, presentan el gen *eaeA* y los factores necrotizantes (CNF1, CNF2) (63).

**Tabla 1:** Factores de virulencia: de adhesión y de aptitud a la colonización. Adaptada de Kaper (2004) (3).

<b>Factor</b>	<b>Patotipo</b>	<b>Actividad/efecto</b>
<b>IcsA (VirG)</b>	EIEC	Nucleación de los filamentos de actina
<b>Intimin</b>	EPEC, EHEC	Adhesina, induce la respuesta TH1
<b>Dr. adhesins</b>	DAEC	Adherencia, unión al factor de aceleración de la descomposición (DAF), activa P1-3-quinasa, induce la MICA
<b>CFAs</b>	ETEC	Adhesina
<b>Type-1 fimbriae</b>	Todos	Adhesión
<b>Bundle-forming pilus</b>	EPEC	Formación de fimbrias rizadas tipo IV
<b>Aggregative adherence fimbriae</b>	EAEC	Adhesina
<b>Paa</b>	EPEC,EHEC	Adhesina
<b>ToxB</b>	EHEC	Adhesina
<b>Efa-1/LifA</b>	EHEC	Adhesina
<b>Long polar fimbriae (LPF)</b>	EHEC,EPEC	Adhesina
<b>Saa</b>	EHEC	Adhesina
<b>OmpA</b>	EHEC	Adhesina
<b>Curli</b>	Varios	Adhesina, se une a la fibronectina
<b>Dispersin</b>	EAEC	Promueve la colonización, ayuda al a penetración en la mucosa
<b>Aerobactin</b>	EIEC	Adquisición de hierro, sideróforo
<b>Yersiniabactin</b>	Varios	Adquisición de hierro, sideróforo
<b>Chu (Shu)</b>	EIEC	Adquisición de hierro, transporte heme
<b>Flagellin</b>	Todos	Motilidad, induce a la expresión de citoquinas a través del TLR5
<b>Lipopolysaccharide</b>	Todos	Induce la expresión de citoquinas a través de TLR4

**Tabla 2:** Factores de virulencia de *E. coli*: toxinas y efectos. Adaptada de Kaper (2004) (3).

<b>Factor</b>	<b>Patotipo</b>	<b>Actividad/efecto</b>
<b>Heat-labile enterotoxin (LT)</b>	ETEC	ADP ribosilatos y activa adenilato ciclasa, dando lugar a secreción de iones
<b>Shiga toxin (Stx)</b>	EHEC	Depurinar RNA, inhibe la síntesis de proteína, induce a apoptosis
<b>Cytolethal distending toxin (CDT)</b>	Varios	Actividad de DNaseI, bloquea la mitosis en la fase G2/M
<b>Shigella enterotoxin 1 (ShET1)</b>	EAEC, EIEC	Secreción de iones
<b>Urease</b>	EHEC	Degrada la urea a NH <sub>3</sub> y CO <sub>2</sub>
<b>EspC</b>	EPEC	Serina proteasa, secreción de iones
<b>EspP</b>	EHEC	Serina proteasa, corta la coagulación factor V
<b>Pet</b>	EAEC	Serina proteasa, secreción de iones, citotoxicidad
<b>Pic</b>	EAEC, EIEC	Proteasa, mucinasa
<b>SepA</b>	EIEC	Serina proteasa
<b>SigA</b>	EIEC	Secreción de iones
<b>Cycle-inhibiting factor (Cif)</b>	EPEC, EHEC	Bloquea la mitosis en fase G2/M, da lugar a la inactivación de Cdk1
<b>EspF</b>	EPEC, EHEC	Abren uniones estrechas, inducen apoptosis
<b>EspH</b>	EPEC, EHEC	Modula la formación de filopodios y pedestales
<b>Map</b>	EPEC, EHEC	Altera el potencial de la membrana mitocondrial
<b>Tir</b>	EPEC, EHEC	Altera las microvellosidades del potencial de membrana mitocondrial, actividad similar a GAP
<b>IpaA</b>	EIEC	Despolimerización de actina
<b>IpaB</b>	EIEC	Apoptosis, liberación de IL-1, inserción de membrana
<b>IpaC</b>	EIEC	Polimerización de actina, activación de Cdc42
<b>IpaH</b>	EIEC	Modula la inflamación

<b>IpgD</b>	EIEC	Inositol-4- fosfatasa, ampollas de membrana
<b>VirA</b>	EIEC	Desestabilización de microtúbulos, fruncido de membrana
<b>StcE</b>	EHEC	Corta C1-INH, interrumpe la cascada del complemento
<b>Ehx</b>	EHEC	Lisis celular
<b>Cytotoxic necrotizing factors (CNF-1,-2)</b>	EHEC	Alteración del citoesqueleto, necrosis
<b>LifA/Efa</b>	EPEC, EHEC	Inhiben la activación y adhesión de los linfocitos
<b>Shigella enterotoxin 2 (ShET2)</b>	EIEC, ETEC	Secreción de iones
<b>Heat-stable enterotoxin a (STa)</b>	ETEC	Activa la guanilato ciclasa, resultado en la secreción de iones
<b>Heat-stable enterotoxin b (STb)</b>	ETEC	Aumenta el calcio intracelular dando como resultado la secreción de iones
<b>EAST</b>	Varios	Activa la guanilato ciclasa, que promueve la secrecion de iones

## 1.8 Metodología para la identificación de *E. coli*

En el laboratorio de microbiología se pueden aplicar múltiples métodos para abordar la identificación microbiana, entre los que cabe destacar los métodos fenotípicos o “tradicionales, los métodos moleculares y los métodos proteómicos. El objetivo principal de estas técnicas es la identificación de los microorganismos implicados en la calidad, seguridad, inocuidad y tecnología alimentaria o presentan importancia clínica.

### 1.8.1 Métodos fenotípicos

En la actualidad, la identificación bacteriana realizada por métodos convencionales basados en las características fenotípicas son utilizados debido a su bajo coste y su bajo nivel de complejidad (64).

Estos métodos se basan en las características que las bacterias expresan al crecer, como su morfología, el uso de ciertos hidratos de carbono o la hidrólisis de algunos compuestos derivados de enzimas concretos, es decir, según sus



características bioquímicas y metabólicas. Por ello, el cultivo continúa siendo el método de diagnóstico de elección, permitiendo el aislamiento del microorganismo implicado y su identificación, estudiar la sensibilidad a los antimicrobianos y facilitar la aplicación de marcadores epidemiológicos (64).

Entre sus inconvenientes, se requiere de una buena formación y experiencia del microbiólogo para la elección de las pruebas para la identificación de un microorganismo concreto, así como, la falta de concordancia entre las características morfológicas y/o fenotípicas observables de los aislamientos en estudio y las correspondientes a las cepas de la especie tipo, hace que la identificación no sea definitiva (64). Además, las condiciones de cultivo pueden provocar cambios en las características fenotípicas de las bacterias. No obstante, estos métodos permiten una mejor descripción de las cepas en estudio.

### **1.8.2 Métodos moleculares**

Hasta hace algunos años, se consideraba a los métodos moleculares como procedimientos complementarios o alternativos para la identificación bacteriana, que permiten solventar las limitaciones de los métodos fenotípicos (64). En la actualidad, los métodos moleculares son utilizados como métodos de referencia para la identificación bacteriana.

Las técnicas de identificación molecular en bacterias se basan en la amplificación genómica y en la secuenciación de una amplia variedad de genes o parte de estos, por ejemplo, el gen 16SrRNA, ya sea de forma parcial o total. El medio de cultivo o las condiciones de incubación no son determinantes, mientras que la extracción del ADN cromosómico y la amplificación son considerados factores críticos que debe tenerse en cuenta en la metodología de identificación molecular. La observación de la secuencia de amplificación en el electroferograma resulta el primer paso de análisis (64).

Entre las nuevas tecnologías para la identificación molecular microbiana se encuentra la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), que permite la obtención de diagnósticos sensibles y específicos en el menor espacio de tiempo posible. Sin embargo, esta técnica se caracteriza por ser muy susceptible a errores de ejecución y de contaminación. Por ello, requiere de una formación especializada previa del personal que ejecute los análisis (65).

### 1.8.3 Métodos proteómicos

Las técnicas de proteómica se basan en el estudio y caracterización de un conjunto de proteínas expresadas por un genoma (proteoma), las más utilizadas son la electroforesis y la espectrometría de masas (64).

La espectrometría de masas se caracteriza por ser una técnica que permite analizar con gran precisión la composición de diferentes elementos químicos, a través de la medición de iones derivados de moléculas separándolos en función de su relación masa/carga ( $m/z$ ). En la actualidad, la más utilizada es la espectrometría de masas MALDI-TOF; denominado así por sus siglas en inglés, MALDI (desorción/ionización por láser asistida por matriz) y TOF (analizador tiempo de vuelo). En los últimos años, esta técnica se ha empezado a utilizar como método rápido y fiable para la identificación bacteriana (64). Estas técnicas se caracterizan por el análisis de proteínas concretas, especialmente proteínas ribosomales.

Entre los inconvenientes de la metodología del MALDI-TOF destacan la necesidad de mantener el vacío que el espectrómetro requiere para trabajar, de aplicar calibraciones y controles de calidad frecuentes y de formar al personal que ejecute el análisis (64). Además, en algunas cepas bacterianas se necesita de una extracción muy meticulosa para lograr una identificación con alto nivel de puntuación.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo general

Caracterizar los aislamientos de bacterias obtenidas de la zona colorrectal de conejos con sintomatología diarreica criados en granjas, mediante las técnicas moleculares MALDI-TOF y PCR.

### 2.2 Objetivos específicos:

Identificar los aislamientos obtenidos de la zona colorrectal de conejo de granjas con sintomatología diarreica, a través de la técnica MALDI-TOF.

Estudiar la presencia de factores de virulencia en cepas de *E. coli* aisladas de conejos de granjas con sintomatología diarreica, mediante PCR.

### 3 MATERIALES Y MÉTODOS

En el siguiente apartado se describe como se ha llevado a cabo la toma de muestras a partir de conejos con sintomatología diarreica. Así como, la metodología utilizada para la identificación de bacterias y la determinación de la presencia de factores patógenos de *Escherichia coli*, en las muestras estudiadas.

#### 3.1 Toma de muestras

Se aislaron un total de 130 cepas provenientes de la zona colorrectal de 12 conejos de 35 días de edad, de raza californiana y neozelandesa que presentaban sintomatología diarreica, provenientes de explotaciones de la región de Tulancingo Hidalgo (México). Los conejos fueron sacrificados conforme a la norma oficial Mexicana NOM-056-SAG-ZOO-2014 para su posterior necropsia y toma de muestras del contenido fecal en condiciones asépticas.

Una vez obtenidas las muestras, se conservaron en un buffer de agua de peptona de pH 7,2 durante 2 horas en refrigeración a 4°C y se trasladaron al laboratorio para su posterior análisis.

A partir del contenido fecal se utilizó 1 ml para realizar diluciones seriadas  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$ , las cuales fueron sembradas en agar estándar "Oxoid" e incubadas a 37°C durante 48 horas. Se eligió la dilución  $10^{-4}$ , en la cual se obtuvieron colonias aisladas que fueron transferidas con un asa bacteriológico a caldo de soya y triple caseína con 0.05 % de extracto de levadura "Oxoid" e incubadas a 37°C durante 24 horas en condiciones microaerófilas. Posteriormente, se recuperó 1 ml del cultivo, se centrifugó a 3500 rpm durante 5 min y el precipitado bacteriano "*pellet*" se conservó con caldo de soya triple caseína y glicerol al 50% V/V en crio-tubos a -20°C hasta su uso.

#### 3.2 Identificación bacteriana mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF)

Se identificaron un total de 90 cepas mediante espectrometría de masas, las cuales se sembraron en caldo TSB (Trypto-casein Soy Broth, CONDA) con 0.5 % de extracto de levadura y se incubaron a 37°C durante 18 horas. Posteriormente, se sembraron en placas Agar TSA por el método de agotamiento en superficie y se incubaron a 37°C para verificar la pureza de los aislamientos. A partir de las placas que contenían un solo tipo de colonias se prepararon las muestras para el análisis

mediante espectrometría de masas MALDI-TOF con el sistema MALDI BioTyper (Bruker Daltonik).

Dos colonias de uno de los aislamientos puros, obtenidos según lo descrito en el párrafo anterior, fueron transferidas a la placa de ensayo (Steel Target Sample Plate) del MALDI-TOF. Posteriormente, se dejó secar al aire y, una vez seco, se agregó 1µL de ácido fórmico al 70% sobre el pocillo dejándolo secar nuevamente a temperatura ambiente. A continuación, se añadió 1µL de matriz ácido  $\alpha$ -cyano-4-hidroxicinámico disuelto en una solución saturada de acetonitrilo y ácido trifluoroacético, que también se dejó secar al aire. A continuación, se llevó a cabo la identificación de los microorganismos problema utilizando el programa BioTyper (versión 3.1; Bruker Daltonik); para ello, previamente se realizó una calibración externa del espectro de masas utilizando un estándar *E. coli* DH5. La lista de picos generada se comparó con la biblioteca de referencia de MALDI BioTyper 3.1, usando un algoritmo de comparación integrado en el programa. Tras importar el espectro al programa, el proceso de análisis se realizó de forma automática desde su análisis hasta su identificación, sin intervención alguna por parte del usuario.

La comparación de la similitud del espectro problema frente a los al espectro de la biblioteca se obtiene en puntuaciones de similitud denominados niveles de identificación (*score*). El BioTyper (*score*) se identifica con un código de colores en función del valor obtenido (ver Tabla 3).

**Tabla 3.** Nivel de identificación (*score*) de los microorganismos aislados de conejos con diarrea

Rango	Descripción	Símbolos
2,300-3,000	Identificación de especies altamente probable	(+++)
2,000-2,299	Identificación segura de género y probable de especie	(++)
1,700-1,999	Identificación probable de género	(+)
0,000-1,699	Identificación irrelevante	(-)

### **3.3 Detección de factores patógenos en *Escherichia coli* a través de PCR (reacción en cadena de polimerasa)**

#### **3.3.1 Extracción del DNA**

Para llevar a cabo la extracción del DNA se cogió 1 ml de un cultivo de crecimiento de TSB más extracto de levadura después de 24 horas de incubación en

un tubo Eppendorf ® previamente esterilizado. El cuál fue centrifugado durante 2,5 minutos a 12.500 rpm. Seguidamente se retiró el sobrenadante y se resuspendió en 200µL de agua de pureza MiliQ previamente esterilizada.

Posteriormente, la mezcla se calentó en un bloque térmico modelo “Termobloc Multiplaces” durante 10 minutos a 100 °C y después fue introducida en una centrífuga de mesa modelo “Eppendorf” a 12.500 rpm durante 3 minutos. Finalmente, con ayuda de una micropipeta se recuperó el sobrenadante y se congeló hasta su análisis.

### 3.3.2 Selección de genes “diana” y cebadores

Para la caracterización de *Escherichia coli* fueron seleccionados el gen *eaeA* que codifica para la adhesina intimina; VT1, VT2 que codifican para las verotoxinas o “toxinas shiga”; y CNF1, CNF2 que codifican para el factor necrotizante citotóxico.

Los genes de virulencia estudiados, las secuencias de los “primers” o cebadores utilizados (TIB MOLBIOL Syntheselabor, Berlín, Alemania), el tamaño de los fragmentos amplificados, así como, las referencias bibliográficas se encuentran recogidos en la Tabla 4.

**Tabla 4.** “Primers” utilizados en la técnica PCR para la amplificación de la secuencia de fragmentos correspondiente a los genes de virulencia *eaeA*, VT1, VT2, CNF1, CF2 respectivamente.

Gen de virulencia	Secuencia del primer	Fragmento amplificado	Referencia
<b>Gen <i>eaeA</i></b>	F - GACCCGGCACAAGCATAAGC R - CCACCTGCAGCAACAAGAGG	384	(66)
<b>VT 1/ <i>Stx1</i></b>	F - ATAAATCGCCATTCGTTGACTAC R - AGAACGCCCACTGAGATCATC	180	(63)
<b>VT 2/ <i>Stx2</i></b>	F - GGCAGTGTCTGAACTGCTCC R- TCGCCAGTTATCTGACATTCTG	255	(63)
<b>CNF 1</b>	F- GAACTTATTAAGGATAGTAGT R- CATTATTTATAACGCTGCTG	543	(67)
<b>CNF 2</b>	F- AATCTAATTAAAGAGAAC R- CATGCTTTGTATATCTA	543	(67)

### 3.3.3 Mezcla de la reacción (tener en cuenta los controles)

La mezcla de reacción preparada fue para un volumen final de 25 µL. Esta mezcla estuvo compuesta por DNA polimerasa termoestable, Mg<sup>+</sup> (cofactor), dNTP<sub>s</sub>

(desoxirribonucleósidos trifostato) y TAE 1% con un pH 7,8-8,3 (tampón Sigma). Posteriormente, fueron adicionados 0,5 µL de cada cebador directo (F) e inverso (R) en una concentración 12,5 pmolar al tubo con la mezcla de la reacción. Posteriormente, se agregó una cantidad de agua MiliQ estéril necesaria para completar un volumen final de 25 µL (mezcla de la reacción más la muestra) en cada tubo de microcentrífuga. Finalmente, se agregaron los 5 µL de DNA de cada cepa obtenido de la alícuota de sobrenadante de la etapa anterior.

### 3.3.4 Controles

En cada una de las PCR que se realizó fueron introducidos dos controles. Un control positivo obtenido a partir de una cepa de *E. coli* O157:H7 o de una cepa de *E. coli* O111 cedidas amablemente por el área de Tecnología de los Alimentos de la Universidad de León; y un control negativo o “blanco” al cual se había sustituido la muestra de DNA molde por agua MiliQ estéril.

### 3.3.5 Amplificación de fragmentos del DNA

La amplificación de fragmentos del DNA se llevó a cabo a través de la técnica de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) en un termociclador modelo “Eppendorf” aplicando las condiciones descritas por Paton y Paton (66) para la programación del proceso, siendo ajustadas a las limitaciones del termociclador. Los tubos de microcentrífuga con el DNA molde junto con la mezcla de la reacción se sometieron a una programación completa que comenzó con un proceso inicial de calentamiento a 95°C durante 5 minutos. Posteriormente, los tubos se sometieron a 35 ciclos de amplificación de DNA distribuidos en dos etapas. La primera etapa formada por 10 ciclos distribuidos en tres subetapas: primera subetapa a 95°C durante 1 minutos, para la separación de ambas cadenas de DNA; segunda subetapa a 60°C durante 2,5 minutos, para la hibridación de los cebadores o “annealing”; tercera subetapa a 72°C durante 1,5 minutos, para la elongación de los cebadores. La segunda etapa formada por 20 ciclos distribuidos en tres subetapas realizadas en las mismas condiciones que la etapa anterior a diferencia de la subetapa de hibridación de los cebadores o “annealing”, la cual se dividió en dos temperaturas: una primera a 62°C durante 1,5 minutos y una segunda de 65°C durante 1,5 minutos. Finalmente, se agregó una etapa de periodo de elongación adicional da 72°C durante 10 minutos junto con un periodo a 4°C a tiempo infinito para la conservación del producto obtenido durante el proceso.

### 3.3.6 Ajustes previos a las condiciones de la PCR final

Se realizaron dos ensayos previos con condiciones de PCR diferentes, ajustándose a las condiciones del termociclador. En la primera PCR los tubos de microcentrífuga con el DNA molde junto con la mezcla de la reacción se sometieron a una programación completa formada por 30 ciclos de amplificación de DNA distribuidos en cuatro etapas. La primera etapa formada por 10 ciclos distribuidos en tres subetapas: primera subetapa a 95°C durante 1 minuto; segunda subetapa a 65°C durante 2 minutos; tercera subetapa a 72°C durante 1,5 minutos. La segunda etapa formada por 5 ciclos distribuidos en tres subetapas: primera subetapa realizada en las mismas condiciones que en la anterior etapa; segunda subetapa a 63°C durante 2 minutos; tercera subetapa a 72°C durante 2 minutos. La tercera etapa formada por 7 ciclos realizados en las mismas condiciones que la anterior etapa, a excepción de la segunda etapa que fue realizada a 62°C durante 2 minutos. La cuarta etapa formada por 8 ciclos distribuidos en tres subetapas: la primera subetapa realizada en las mismas condiciones que en la etapa anterior; segunda subetapa realizada a 60°C durante 2 minutos; tercera subetapa realizada a 72°C durante 1,5 minutos. En este ensayo no se agregó una etapa de periodo de elongación adicional a 72°C, ni el periodo a 4°C a tiempo infinito para la conservación del producto obtenido durante el proceso.

En la segunda PCR los tubos de microcentrífuga con el DNA molde junto con la mezcla de la reacción se sometieron a una programación completa que comenzó con un proceso inicial de calentamiento a 95°C durante 5 minutos. Posteriormente, los tubos se sometieron a una programación completa formada por 25 ciclos de amplificación de DNA distribuidos en tres etapas. La primera etapa formada por 7 ciclos distribuidos en tres subetapas: primera subetapa a 95°C durante 1 minuto; segunda subetapa a 65°C durante 2 minutos; tercera subetapa a 72°C durante 1,5 minutos. La segunda etapa formada por 8 ciclos distribuidos en tres subetapas realizada en las mismas condiciones que en la anterior etapa, excepto la subetapa dos que fue a 63°C durante 2 minutos. La tercera etapa formada por 10 ciclos realizados en las mismas condiciones que la anterior etapa, a excepción de la segunda subetapa que fue realizada a 62°C durante 2 minutos. En este ensayo se agregó un periodo a 4°C a tiempo infinito para la conservación del producto obtenido durante el proceso.

Finalmente, se realizó la tercera PCR descrita en el apartado anterior en la que se ajustaron las condiciones de "annealing" y se añadió una etapa de periodo de

elongación adicional da 72°C durante 10 minutos, antes del periodo de conservación del producto obtenido a 4°C a tiempo infinito.

### 3.3.7 Análisis de los productos de la reacción de PCR

La separación de los productos amplificados por la PCR se realizó mediante electroforesis en un gel de Agarosa “Sigma Aldrich” al 2% en un tampón TAE al 1% (Tris base 2M, ácido acético glacial 5,7% y EDTA 0,025 M ajustado a pH 7,9) suplementado con 0,4 µ/L de colorante Gel RED ® con el objetivo de visualizar las bandas de DNA. Para ello, se depositó 5 µL de marcador mezclado con 10 µL de Buffer de carga en uno de los pocillos y 10 µL de cada producto obtenido de la PCR mezclados con 10 µL de tampón de carga en el resto de pocillos, formados previamente al retirar los peines del gel. Posteriormente, se colocaron los electrodos, teniendo en cuenta una correcta disposición de estos, para realizar una diferenciación de potencial desde el polo negativo hacia el polo positivo comprendida entre 70-100 V durante el tiempo necesario para la correcta resolución de las bandas. Finalmente, el resultado de la electroforesis se realizó observando los geles en un transiluminador de luz ultravioleta modelo” Bio Rad”

## 4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 5, se muestran los resultados de las distintas condiciones ensayadas para detectar los genes de virulencia a través de una PCR multiplex. Los ciclos de temperatura y tiempo de las distintas condiciones ensayadas se encuentran descritas en el apartado de materiales y métodos, en la sección 3.4.6. Como podemos observar en la Tabla 5, las condiciones de la PCR2 y PCR3 permitieron la detección de los genes de virulencia *Stx2* y el gen *eaeA*. Al comparar, las condiciones de la PCR2 y PCR3, las temperaturas de hibridación de la PCR2 eran superiores a las temperaturas óptimas de hibridación o “annealing” recomendadas por el proveedor; por lo tanto se decidió disminuir la temperatura en esta etapa de hibridación. Las temperaturas de hibridación son específicas para cada primer; si esta temperatura es muy baja obtendremos un producto de PCR menos específico, es decir, una amplificación inespecífica. Mientras que, si la temperatura es muy alta, la especificidad será mayor; aunque tiene un límite, ya que si esta estuviera muy por encima de la temperatura máxima de hibridación no se obtendría ningún producto durante la amplificación. Esto se debe a que la unión de los oligonucleótidos con sus sitios complementarios sería poco estable y la polimerasa no podría iniciar la síntesis de la hebra de ADN (68).



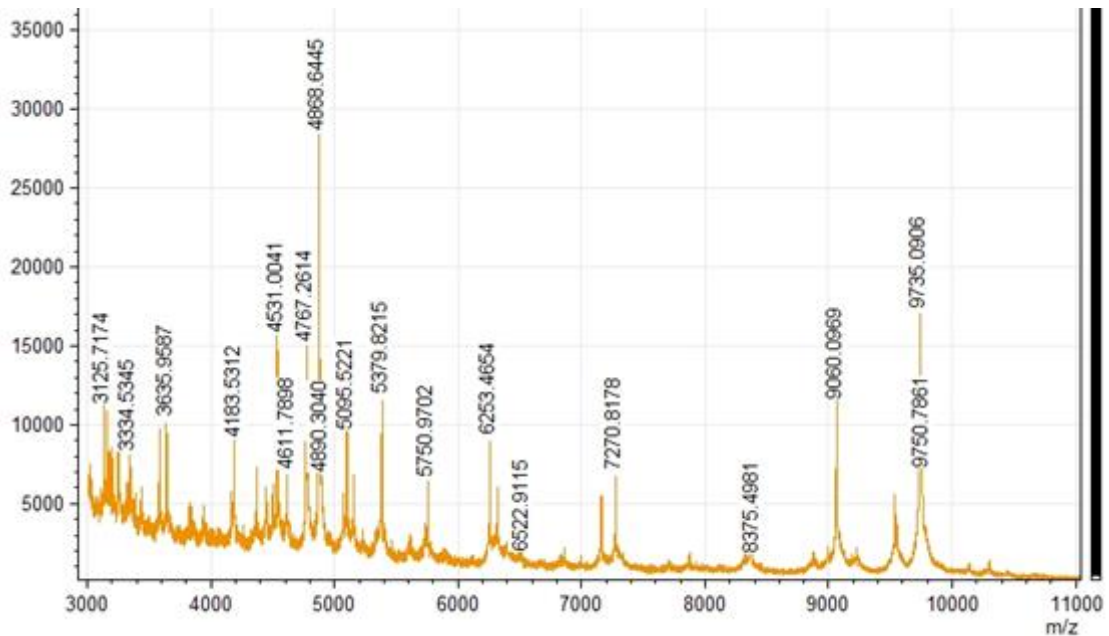
Así mismo, con el objetivo de mejorar el producto obtenido de la PCR se agregó una etapa de elongación que consistió en subir la temperatura a 72°C durante 10 minutos. Esta etapa se adicionó antes de la última fase correspondiente a la conservación del producto obtenido a 4°C sin tiempo predeterminado, es decir, infinito. Debido a las últimas condiciones establecidas y para un mejor rendimiento de la PCR se decidió utilizar las condiciones de la PCR3. La etapa de elongación/extensión permite asegurar que el ADN amplificado es bicatenario. Debido a que la etapa de elongación evita amplificar erróneamente las hebras de ADN, diversos autores la integran en el ciclo de la PCR (69)(70)(71). Aunque algunos autores consideran que esta etapa no es tan importante como las etapas de desnaturalización y de “annealing”/hibridación, siendo las temperaturas de estas etapas las más críticas (72). Es posible que la adición de la etapa de elongación durante el ciclo de amplificación de la PCR permitiera mejorar la calidad de la amplificación del ADN de los genes *Stx2* y el gen *eaeA*, ya que fue más fácil observar las bandas. En ninguna de las condiciones ensayadas fue posible observar el fragmento correspondiente al gen *Stx1*. La ausencia de la amplificación de ese gen pudo deberse, según lo indica Paton y Paton, al polimorfismo que puede presentar este gen (73).

**Tabla 5.** Resultados de la puesta a punto de la PCR en función de las condiciones introducidas en el termociclador, ya descritas en el apartado de materiales y métodos.

Condiciones de PCR	<i>Stx1</i>	<i>Stx2</i>	Gen <i>eaeA</i>
PCR1	-	-	-
PCR2	-	+	+
PCR3	-	+	+

En la Tabla 6 se recoge la identificación de los 90 aislamientos obtenidos de conejos con sintomatología diarreica. *Escherichia coli* fue la especie que se aisló con mayor frecuencia, aproximadamente un 84% de los aislamientos correspondieron a esta especie (ver Figura 5). Diversos autores han aislado esta bacteria en conejos tanto con sintomatología diarreica, como en conejos sanos (63)(74)(75). Estos autores únicamente han estudiado los aislamientos que procedían de Agar MacConkey, un medio selectivo con características propias para *E. coli*; por lo tanto, consideraban los aislamientos como presuntos *Escherichia coli*. Sin embargo, en este estudio se aislaron bacterias que crecían en condiciones de micro-anaerobiosis (CO<sub>2</sub> 5%) y en un medio de cultivo general, como el medio TSA. Debido a estas diferencias no hemos podido comparar nuestros resultados con los autores mencionados.

En la Figura 4, se muestra el perfil de espectro de masas obtenido de la cepa 28 identificada como *E. coli*. Como se puede observar en el espectro de masas, el tamaño de las proteínas ribosómicas utilizadas para la identificación de las bacterias oscila entre 3.125 y 9.735 m/z. El nivel de identificación de cada cepa aislada es el resultado de comparar el perfil del espectro de masas con los perfiles de la biblioteca de la base de datos BioTyper, niveles superiores a una determinada puntuación son considerados como identificación de alto valor de confianza (ver sección 3.2) (76).



**Figura 4.** Perfil del espectro de masas obtenido a través de MALDI TOF de la cepa de *E. coli* que presentó el gen *eaeA*.

Respecto a los resultados de identificación obtenidos por MALDI TOF, el 84% de los aislamientos fueron identificados como *E. coli*. Se observó un alto nivel de identificación por encima de 2,0, es decir, el 94,7% de los aislamientos se identificaron con un alto valor de confianza (ver Tabla 6). Sólo un 5,26% de los aislamientos se identificaron a nivel de género, siendo identificados como *Escherichia*, aunque el programa BioTyper lo considera identificado a nivel de especie; debido a que el nivel de identificación fue inferior a 2 pero superior a 1,82, con una media de 1,93 de nivel de identificación. La segunda especie aislada con mayor frecuencia del intestino de los conejos fue *Enterococcus faecalis* con un porcentaje del 7% (ver Figura 5) y su nivel de identificación fue superior a 2,094 (ver Tabla 6). Finalmente, *Morganella morganii* fue la tercera especie que se aisló de conejos con un 6% (ver Figura 5) y un nivel de identificación superior a 2,5. Diversos autores han identificado *E. coli* por MALDI TOF utilizando la base de datos de BioTyper (76)(77). El nivel de identificación observado en este estudio fue inferior al observado por Timm et al., (76), quienes identificaron el

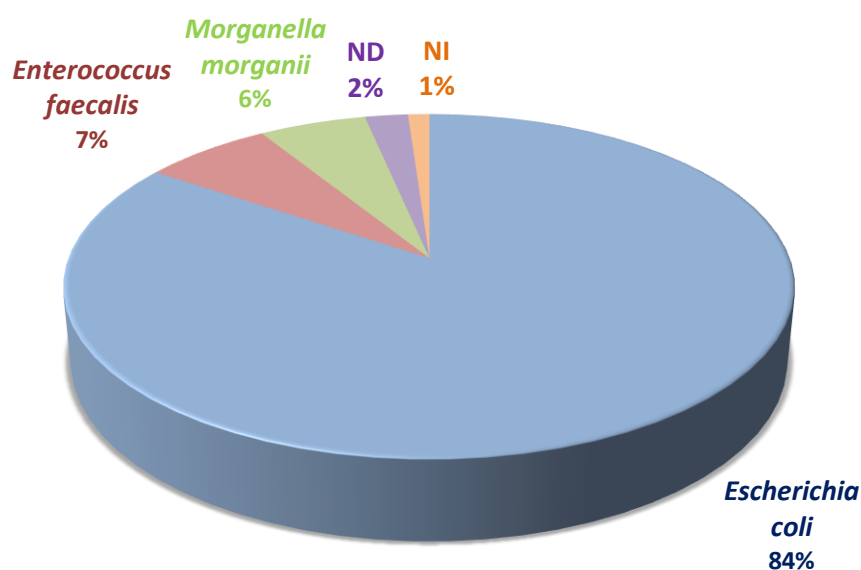
100% de *E. coli* con el método mencionado a partir de bacterias gram negativas recuperadas de muestras clínicas, con un alto valor de confianza (score superior a 2). Así mismo, Christner et al., (77) identificó correctamente el 99,7% de *Escherichia coli* productora de verotoxinas por MALDI TOF, procedente del aislamiento de *E. coli* a partir de hisopos de heces rectales y orina. Además, Timm et al., (76) obtuvieron menor porcentaje de aislamientos identificados con un valor de baja confianza (3,2%), en comparación con este estudio en el que se encontró un 5,26%. La presencia de *Morganella morganii* y *Enterococcus faecalis* puede deberse a que son bacterias que forman parte de la microbiota del tracto intestinal de humanos y animales (78)(79).

**Tabla 6.** Identificación bacteriana de aislamientos obtenidos de conejo con sintomatología diarreica.

Nº cepa	Microorganismo	SCORE	Nº cepa	Microorganismo	SCORE
1	<i>Escherichia coli</i>	2,100	22	<i>Escherichia coli</i>	2,183
2	<i>Escherichia coli</i>	1,933	23	<i>Escherichia coli</i>	2,209
3	<i>Escherichia coli</i>	2,268	24	<i>Escherichia coli</i>	2,296
4	<i>Escherichia coli</i>	2,182	25	<i>Escherichia coli</i>	2,377
5	<i>Escherichia coli</i>	2,273	26	<i>Escherichia coli</i>	2,196
6	<i>Escherichia coli</i>	2,357	27	<i>Escherichia coli</i>	2,134
7	<i>Escherichia coli</i>	2,173	28	<i>Escherichia coli</i>	2,175
8	NI*	1,693	29	<i>Escherichia coli</i>	2,302
9	<i>Escherichia coli</i>	2,116	30	<i>Escherichia coli</i>	2,290
10	<i>Escherichia coli</i>	2,335	31	<i>Escherichia coli</i>	2,259
11	<i>Enterococcus faecalis</i>	2,156	32	<i>Escherichia coli</i>	2,317
12	<i>Enterococcus faecalis</i>	2,094	33	<i>Escherichia coli</i>	1,826
13	<i>Escherichia coli</i>	2,285	34	<i>Escherichia coli</i>	1,989
14	<i>Escherichia coli</i>	2,409	35	<i>Escherichia coli</i>	2,243
15	<i>Escherichia coli</i>	2,379	36	<i>Escherichia coli</i>	2,243
16	<i>Escherichia coli</i>	2,214	37	<i>Escherichia coli</i>	2,092
17	<i>Escherichia coli</i>	2,208	38	<i>Escherichia coli</i>	2,249
18	<i>Escherichia coli</i>	2,294	39	<i>Escherichia coli</i>	2,166
19	<i>Escherichia coli</i>	2,200	40	<i>Escherichia coli</i>	2,308
21	<i>Escherichia coli</i>	2,330	41	<i>Escherichia coli</i>	2,308

42	ND*	-	67	<i>Escherichia coli</i>	2,178
43	ND*	-	68	<i>Morganella morganii</i>	2,506
44	<i>Escherichia coli</i>	2,388	69	<i>Escherichia coli</i>	2,312
45	<i>Escherichia coli</i>	2,320	70	<i>Escherichia coli</i>	2,332
46	<i>Escherichia coli</i>	2,305	71	<i>Escherichia coli</i>	2,293
47	<i>Escherichia coli</i>	2,324	72	<i>Escherichia coli</i>	2,315
48	<i>Escherichia coli</i>	2,146	73	<i>Escherichia coli</i>	2,333
49	<i>Escherichia coli</i>	2,309	74	<i>Escherichia coli</i>	2,362
50	<i>Escherichia coli</i>	2,344	75	<i>Escherichia coli</i>	2,225
51	<i>Morganella morganii</i>	2,527	76	<i>Enterococcus faecalis</i>	2,230
52	<i>Escherichia coli</i>	2,338	77	<i>Escherichia coli</i>	2,392
53	<i>Escherichia coli</i>	2,382	78	<i>Enterococcus faecalis</i>	2,483
54	<i>Escherichia coli</i>	2,306	79	<i>Escherichia coli</i>	2,459
55	<i>Escherichia coli</i>	2,292	80	<i>Escherichia coli</i>	2,271
56	<i>Escherichia coli</i>	2,357	81	<i>Escherichia coli</i>	2,280
57	<i>Morganella morganii</i>	2,552	82	<i>Escherichia coli</i>	2,352
58	<i>Escherichia coli</i>	2,308	83	<i>Enterococcus faecalis</i>	2,321
59	<i>Escherichia coli</i>	2,331	84	<i>Enterococcus faecalis</i>	2,553
60	<i>Escherichia coli</i>	2,413	85	<i>Escherichia coli</i>	2,359
61	<i>Morganella morganii</i>	2,500	86	<i>Escherichia coli</i>	2,288
62	<i>Escherichia coli</i>	2,189	87	<i>Escherichia coli</i>	2,290
63	<i>Escherichia coli</i>	2,293	88	<i>Escherichia coli</i>	2,435
64	<i>Escherichia coli</i>	2,242	89	<i>Escherichia coli</i>	2,254
65	<i>Escherichia coli</i>	2,349	90	<i>Escherichia coli</i>	2,403
66	<i>Morganella morganii</i>	2,530			

\*NI: cepa no identificada; ND: cepa no determinada



**Figura 5.** Porcentaje de identificación de cada microorganismo de aislamientos obtenidos en conejos con sintomatología diarreica.

En la Tabla 7, se encuentra la caracterización de 30 de los aislamientos identificados como *Escherichia coli* por MALDI-TOF. Ninguna de las cepas fue positiva para los genes *Stx1* y *Stx2* y únicamente el 3,3% de las cepas fueron positivas al gen *eaeA*. El gen *eaeA* es un gen que codifica la expresión o formación de una proteína de membrana (94 kDa), denominada intimina, que es la responsable de la adherencia de esta bacteria a la membrana del enterocito (9) y del barrido de las microvellosidades del epitelio intestinal producido en las infecciones por *E. coli* verotoxigénica (80). Este gen ha sido el factor de virulencia que con mayor frecuencia se ha encontrado en las *E. coli* aisladas de conejos con sintomatología diarreica (63)(74)(75). Blanco et al., (63) estudiaron 304 cepas de *E. coli* que provenían de conejos con diarrea y sanos, encontrando que 74% de los aislamientos portaban el gen *eaeA*. Este gen también se encontró en un 61% de los aislamientos de *E. coli* provenientes de animales con las mismas características (74). Sin embargo, el gen *eaeA* también fue aislado de *E. coli* provenientes de conejos sanos (63)(74)(75). El porcentaje de *E. coli* que portaban el gen *eaeA* en este estudio fue muy inferior a lo observado por otros autores (63)(74)(75). Esta diferencia observada puede deberse a: i) que el gen *eaeA* presenta una importante variabilidad de su código genético entre las distintas cepas de *E. coli* y los cebadores utilizados en este estudio no han sido capaces de amplificar la variante del gen *eaeA* presente en estos aislamientos (81)(82) y ii) que en este estudio sólo se ha realizado el análisis de la tercera parte de los aislamientos totales y puede existir un sesgo en los resultados.

**Tabla 7.** Genes de virulencia de *Escherichia coli* aisladas de conejo con sintomatología diarreica.

Nº de cepas de <i>Escherichia coli</i>	Genes de virulencia		
	<i>Stx1</i>	<i>Stx2</i>	Gen <i>eaeA</i>
30	-	-	3,3%

## 5 CONCLUSIONES

La PCR multiplex es una técnica con alta especificidad que permite la detección de diversos factores de virulencia de *E. coli*. No obstante, este método requiere de una optimización de las condiciones de ensayo. La adición de la etapa de elongación ha permitido obtener las amplificaciones de los fragmentos del gen *eaeA* y *Stx2* con mayor nitidez.

La bacteria predominante en la zona colorrectal de conejos de granjas con sintomatología diarreica fue *Escherichia coli*. El porcentaje de esta bacteria respecto al total de los aislamientos obtenidos a través de la técnica MALDI TOF fue del 84%.

De los aislamientos identificados como *E. coli*, un 3,3% poseían el gen *eaeA*. Sin embargo, el número de *E. coli* patógenas podría ser mayor; ya que no se han estudiado otros genes de virulencia, como el gen del factor necrotizante. Así mismo, en este estudio sólo se analizó la presencia del gen *eaeA* en un tercio de las cepas identificadas como *E. coli*.

En futuros estudios se sugiere evaluar la prevalencia de cepas de *E. coli* patógenas en canales de conejos para ayudar a reducir el riesgo de brotes en humanos asociados a la presencia de estos microorganismos.

## 6 BIBLIOGRAFÍA

1. Patrick R. Murray P, Ken S. Rosenthal P, Michael A. Pfaller M. Microbiología Médica. 2014. 996 p.
2. McLandsborough L. Food microbiology laboratory. Food Microbiology Laboratory. 2004. 1-173 p.
3. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HLT. Pathogenic *Escherichia coli*. Nat Rev Microbiol. 2004;2(2):123-40.
4. Rodríguez-Angeles MG. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. Salud Publica Mex. 2002;44(5):464-75.
5. Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev. 1998;11(1):142-201.
6. Bettelheim KA. The non-O157 Shiga-toxigenic (verocytotoxigenic) *Escherichia coli*; under-rated pathogens. Crit Rev Microbiol. 2007;33(1):67-87.
7. Donnenberg MS. Genetics of enteropathogenic *Escherichia coli* virulence factors. Rev Microbiol. 1996;27(SUPPL. 1):104-8.
8. Clarke SC, Haigh RD, Freestone PPE, Williams PH. Virulence of Enteropathogenic. 2003;16(3):365-78.
9. Trabulsi LR, Keller R, Tardelli Gomes TA. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. Emerg Infect Dis. 2002;8(5):508-13.
10. Donnenberg M, Kaper JB. Enteropathogenic *Escherichia coli*. Infect immunity. 1992;60:3953-61.
11. Knutton S, Lloyd DR, McNeish AS. Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to human intestinal enterocytes and cultured human intestinal mucosa. Infect Immun. 1987;55(1):69-77.
12. Jarvis KG, Kaper JB. Secretion of extracellular proteins by enterohemorrhagic *Escherichia coli* via a putative type III secretion system. Infect Immun. 1996;64(11):4826-9.
13. Qadri F, Svennerholm A-M, Faruque ASG, Sack R. B. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in Developing Countries: Epidemiology, Microbiology, Clinical Features, Treatment, and Prevention. Clin Microbiol Rev. 2005;18 (3):465-83.

14. Sears CL, Kaper JB. Enteric bacterial toxins: Mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. *Microbiol Rev.* 1996;60(1):167-215.
15. Cassels FJ, Wolf MK. Colonization factors of diarrheagenic *E. coli* and their intestinal receptors. *J Ind Microbiol.* 1995;15(3):214-26.
16. Levine MM. *Escherichia Coli* that Cause Diarrhea: Enterotoxigenic, Enteropathogenic, Enteroinvasive, Enterohemorrhagic, and Enteroadherent. *J Infect Dis.* 1987;155(3):377-81.
17. UdDin A, Wahid S. Relationship among *Shigella spp.* *Brazilian J Microbiol.* 2014;45(4):1131-8.
18. Riley L, Remis R, Helgerson S, McGee H, Wells J, Davis B, et al. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N Engl J Med.* 1983;308(12):681-5.
19. Bettelheim KA. Non-0157 Verotoxin-Producing. *Exp Biol Med.* 2003;228:333-44.
20. Benjamin MM, Datta AR. Acid tolerance of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.* 1995;61(4):1669-72.
21. Padhye N V., Doyle MP. *Escherichia coli* O157:H7: Epidemiology, pathogenesis, and methods for detection in food. *J Food Prot.* 1992;55(7):555-65.
22. Melton-Celsa AR. *Shiga* Toxin (*Stx*) Classification, Structure, and Function. *Microbiol Spectr.* 2014;2(4):1-21.
23. Proulx F, Seidman EG, Karpman D. Pathogenesis of Shiga Toxin-Associated Hemolytic Uremic Syndrome. *Pediatr Res.* 2001;50(2):163-71.
24. Te Loo DMWM, Van Hinsbergh VWM, Van Den Heuvel LPWJ, Monnens LAH. Detection of verocytotoxin bound to circulating polymorphonuclear leukocytes of patients with hemolytic uremic syndrome. *J Am Soc Nephrol.* 2001;12(4):800-6.
25. Donnenberg MS, Tzipori S, McKee ML, O'Brien AD, Alroy J, Kaper JB. The role of the *eae* gene of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in intimate attachment in vitro and in a porcine model. *J Clin Invest.* 1993;92(3):1418-24.
26. Schmidt H, Beutin L, Karch H. Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933. *Infect Immun.* 1995;63(3):1055-61.



27. WHO Scientific Working Group Meeting. Zoonotic non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC). Rep a WHO scintific Work Gr meetin [Internet]. 1998;1-35. Disponible en: [http://whqlibdoc.who.int/hq/1998/WHO\\_CSR\\_APH\\_98.8.pdf](http://whqlibdoc.who.int/hq/1998/WHO_CSR_APH_98.8.pdf)
28. Feng P, Sandlin RC, Park CH, Wilson RA, Nishibuchi M. Identification of a rough strain of *Escherichia coli* O157:H7 that produces no detectable O157 antigen. J Clin Microbiol. 1998;36(8):2339-41.
29. Griffin PM, Tauxe R V. The Epidemiology of Infections Caused by *Escherichia coli* O157: H7, Other Enterohemorrhagic *E. coli*, and the Associated Hemolytic Uremic Syndrome. Epidemiol Rev. 1991;13(1):60-98.
30. Besser RE, Lett SM, Weber JT, Doyle MP, Barrett TJ, Wells JG, et al. An Outbreak of Diarrhea and Hemolytic Uremic Syndrome From *Escherichia coli* O157:H7 in Fresh-Pressed Apple Cider. JAMA J Am Med Assoc. 1993;269(17):2217-20.
31. Andreoli SP, Trachtman H, Acheson DWK, Siegler RL, Obrig TG. Hemolytic uremic syndrome: epidemiology, pathophysiology, and therapy. Pediatr Nephrol. 2002;17(4):293-8.
32. Nataro JP, Kaper JB, Robins-Browne R, Prado V, Vial P, Levine MM. Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. Vol. 6, Pediatric Infectious Disease Journal. 1987. p. 829-31.
33. Vial PA, Robins-Browne R, Lior H, Prado V, Kaper JB, Nataro JP, et al. Characterization of enteroadherent-aggregative *Escherichia coli*, a putative agent of diarrheal disease. J Infect Dis. 1988;158(1):70-9.
34. Rogawski ET, Guerrant RL, Havt A, Lima IFN, Medeiros PHQS, Seidman JC, et al. Epidemiology of enteroaggregative *Escherichia coli* infections and associated outcomes in the MAL-ED birth cohort. PLoS Negl Trop Dis. 2017;11(7):1-17.
35. Jenkins C. Enteroaggregative *Escherichia coli*. Curr Top Microbiol Immunol. 2018;416:27-50.
36. Nataro JP, Deng Y, Maneval DR, German AL, Martin WC, Levine MM. Aggregative adherence fimbriae I of enteroaggregative *Escherichia coli* mediate adherence to HEp-2 cells and hemagglutination of human erythrocytes. Infect

- Immun. 1992;60(6):2297-304.
37. Czczulin JR, Balepur S, Hicks S, Phillips A, Hall R, Kothary MH, et al. Aggregative adherence fimbria II, a second fimbrial antigen mediating aggregative adherence in enteroaggregative *Escherichia coli*. Infect Immun. 1997;65(10):4135-45.
  38. Henderson IR, Czczulin J, Eslava C, Noriega F, Nataro JP. Characterization of Pic, a secreted protease of *Shigella flexneri* and enteroaggregative *Escherichia coli*. Infect Immun. 1999;67(11):5587-96.
  39. Savarino SJ, McVeigh A, Watson J, Cravioto A, Molina J, Echeverria P, et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin is not restricted to enteroaggregative *E. coli*. J Infect Dis. 1996;173(4):1019-22.
  40. Villaseca JM, Navarro-Garcia F, Mendoza-Hernandez G, Nataro JP, Cravioto A, Eslava C. Pet toxin from enteroaggregative *Escherichia coli* produces cellular damage associated with fodrin disruption. Infect Immun. 2000;68(10):5920-7.
  41. Baudry B, Savarino SJ, Vial P, Kaper JB, Levine MM. A sensitive and specific dna probe to identify enteroaggregative *Escherichia coli*, a recently discovered diarrheal pathogen. J Infect Dis. 1990;161(6):1249-51.
  42. Bilge SS, Clausen CR, Lau W, Moseley SL. Molecular characterization of a fimbrial adhesin, F1845, mediating diffuse adherence of diarrhea-associated *Escherichia coli* to HEp-2 cells. J Bacteriol. 1989;171(8):4281-9.
  43. Scaletsky ICA, Fabbricotti SH, Carvalho RLB, Nunes CR, Maranhão HS, Moraes MB, et al. Diffusely adherent *Escherichia coli* as a cause of acute diarrhea in young children in northeast Brazil: A case-control study. J Clin Microbiol. 2002;40(2):645-8.
  44. Peiffer I, Servin AL, Bernet-Camard MF. Piracy of decay-accelerating factor (CD55) signal transduction by the diffusely adhering strain *Escherichia coli* C1845 promotes cytoskeletal F- actin rearrangements in cultured human intestinal INT407 cells. Infect Immun. 1998;66(9):4036-42.
  45. Benz I, Schmidt MA. Isolation and serologic characterization of AIDA-I, the adhesin mediating the diffuse adherence phenotype of the diarrhea-associated *Escherichia coli* strain 2787 (O126:H27). Infect Immun. 1992;60(1):13-8.

46. Servin AL. Pathogenesis of human diffusely adhering *Escherichia coli* expressing Afa/Dr adhesins (Afa/Dr DAEC): Current insights and future challenges. *Clin Microbiol Rev.* 2014;27(4):823-69.
47. Girón JA, Jones T, Miilán-Velasco F, Castro-Muñoz E, Zárate L, Fry J, et al. Diffuse-adhering *Escherichia coli* (DAEC) as a putative cause of diarrhea in mayan children in Mexico. *J Infect Dis.* 1991;163(3):507-13.
48. Croxen MA, Law RJ, Scholz R, Keeney KM, Wlodarska M, Finlay BB. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev.* 2013;26(4):822-80.
49. Jensen BH, Olsen KEP, Struve C, Krogfelt KA, Petersen AM. Epidemiology and clinical manifestations of enteroaggregative *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev.* 2014;27(3):614-30.
50. FAO. Prevención de la *E. coli* en los alimentos. El Marco Gestión Cris para la Cadena Aliment [Internet]. 2011;4-13. Disponible en: [http://www.fao.org/fileadmin/user\\_upload/agns/pdf/Preventing\\_Ecoli\\_es.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/agns/pdf/Preventing_Ecoli_es.pdf)
51. Mora A, Herrera A, López C, Dahbi G, Mamani R, Pita JM, et al. Characteristics of the Shiga-toxin-producing enteroaggregative *Escherichia coli* O104:H4 German outbreak strain and of STEC strains isolated in Spain. *Int Microbiol.* 2011;14(3):121-41.
52. Organización Mundial de la Salud. Foodborne disease outbreaks: Guidelines for investigation and control. En: WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. 2008. p. 162.
53. Gómez R, Carmona M, Fernández-Salguero J. « ESTUDIO DE LOS ALIMENTOS DE HUMEDAD INTERMEDIA ESPAÑOLES. I. ACTIVIDAD DEL AGUA Y PH». En 1991. p. 8.
54. Científico C. Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición ( AESAN ) sobre medidas de prevención y recomendaciones aplicables para evitar posibles infecciones alimentarias por cepas de *Escherichia coli* verotoxigénicos / .
55. Li H, Gänzle M. Some Like It Hot : Heat Resistance of *Escherichia coli* in Food. 2016;7(November):1-12.

56. Lee S-Y. Microbial Safety of Pickled Fruits and Vegetables and Hurdle Technology. Internet J Food Saf [Internet]. 2004;4:21-32. Disponible en: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.496.875&rep=rep1&type=pdf>
57. Havelaar AH, Kirk MD, Torgerson PR, Gibb HJ, Hald T, Lake RJ, et al. World Health Organization Global Estimates and Regional Comparisons of the Burden of Foodborne Disease in 2010. PLoS Med. 2015;12(12):1-23.
58. Pires SM, Majowicz S, Gill A, Devleeschauwer B. Global and regional source attribution of shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections using analysis of outbreak surveillance data. Epidemiol Infect. 2019;147.
59. Rangel JM, Sparling PH, Crowe C, Griffin PM, Swerdlow DL. Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks, United States, 1982-2002. Emerg Infect Dis. 2005;11(4):603-9.
60. Food E, Authority S. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. EFSA J. 2018;16(12).
61. NORS Dashboard [Internet]. National Outbreak Reporting System (NORS). 2020. Disponible en: <https://wwwn.cdc.gov/norsdashboard/>
62. Centro Nacional de Epidemiología. CIBER Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP). Instituto de Salud Carlos III. Resultados de la vigilancia epidemiológica de las enfermedades transmisibles. Informe anual 2016. Madrid 2018. Resultado de la Vigilancia Epidemiológica de las Enfermedades Transmisibles. Informe Anual. Año 2016. 2018;146.
63. Blanco JE, Blanco M, Blanco J, Mora A, Balaguer L, Mouriño M, et al. O serogroups, biotypes, and *eae* genes in *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic and healthy rabbits. J Clin Microbiol. 1996;34(12):3101-7.
64. Bou G, Fernández-Olmos A, García C, Sáez-Nieto JA, Valdezate S. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2011;29(8):601-8.
65. Méndez-álvarez S, Pérez-roth E. La PCR múltiple en microbiología clínica. 2003;183-92.

66. Paton AW, Paton JC. Detection and characterization of Shiga toxicogenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli hlyA*, *rfbO111*, and *rfbO157*. J Clin Microbiol [Internet]. 1998;36(2):598-602. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=104589&tool=pmcentrez&rendertype=abstract><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9466788><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC104589>
67. Blanco M, Blanco JE, Blanco J, Alonso MP, Balsalobre C, Mouriño M, et al. Polymerase chain reaction for detection in *Escherichia coli* strains producing cytotoxic necrotizing factor type 1 and type 2 (CNF1 and CNF2). J Microbiol Methods. 1996;26(1-2):95-101.
68. Espinosa L. Guía práctica sobre la técnica de PCR 517 Guía práctica sobre la técnica de PCR. Ecol Mol [Internet]. 2007;517-36. Disponible en: <http://www.publicaciones.inecc.gob.mx/libros/530/cap17.pdf>
69. Fratamico PM, Sackitey SK, Wiedmann M, Deng MY. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 by Multiplex PCR. J Clin Microbiol. 1995;33(8):2188-91.
70. Toma C, Lu Y, Higa N, Nakasone N, Chinen I, Baschkier A, et al. Multiplex PCR Assay for Identification of Human Diarrheagenic *Escherichia coli*. J Clin Microbiol. 2003;41(6):2669-71.
71. Stacy-Phipps S, Mecca JJ, Weiss JB. Multiplex PCR assay and simple preparation method for stool specimens detect enterotoxigenic *Escherichia coli* DNA during course of infection. J Clin Microbiol. 1995;33(5):1054-9.
72. Bej AK, Mahbubani MH, Atlas RM, Salki RK. Amplification of nucleic acids by polymerase chain reaction (PCR) and other methods and their applications. Crit Rev Biochem Mol Biol. 1991;26(3-4):301-34.
73. Paton JC, Paton AW. Methods for detection of STEC in humans. An overview. Methods Mol Med. 2003;73:9-26.
74. Penteado AS, Ugrinovich LA, Blanco J, Blanco M, Blanco JE, Mora A, et al. Serotypes and virulence genes of *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic and healthy rabbits in Brazil. Vet Microbiol. 2002;89(1):41-51.
75. Swennes AG, Buckley EM, Madden CM, Byrd CP, Donocoff RS, Rodriguez L, et al. Enteropathogenic *Escherichia coli* prevalence in laboratory rabbits. Vet

- Microbiol. 2013;163(3-4):395-8.
76. Faron ML, Buchan BW, Hyke J, Madisen N, Lillie JL, Granato PA, et al. Multicenter evaluation of the Bruker MALDI Biotyper CA System for the identification of clinical aerobic gram-negative bacterial isolates. PLoS One. 2015;10(11):1-13.
  77. Christner M, Trusch M, Rohde H, Kwiatkowski M, Schlüter H, Wolters M, et al. Rapid MALDI-TOF mass spectrometry strain typing during a large outbreak of Shiga-toxigenic *Escherichia coli*. PLoS One. 2014;9(7):1-11.
  78. Falagas ME, Kavvadia PK, Mantadakis E, Kofteridis DP, Bliziotis IA, Saloustros E, et al. *Morganella morganii* infections in a general tertiary hospital. Infection. 2006;34(6):315-21.
  79. Hammerum AM. *Enterococci* of animal origin and their significance for public health. Clin Microbiol Infect [Internet]. 2012;18(7):619-25. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03829.x>
  80. Blanco M, Blanco JE, Mora A, Dahbi G, Alonso MP, Gonza EA, et al. Serotypes, Virulence Genes, and Intimin Types of Shiga Toxin (Verotoxin)-Producing. Society. 2004;42(2):645-51.
  81. Oswald E, Schmidt H, Morabito S, Karch H, Marchès O, Caprioli A. Typing of intimin genes in human and animal enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*: Characterization of a new intimin variant. Infect Immun. 2000;68(1):64-71.
  82. Nielsen EM, Andersen MT. Detection and characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* by automated 5' nuclease PCR assay. J Clin Microbiol. 2003;41(7):2884-93.