



universidad  
de león

Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos

---

**Caracterización de tipos patógenos de  
*Escherichia coli* y otros peligros  
biológicos asociados a la leche de cabra  
y productos derivados**

---



Memoria presentada por la Licenciada en Biología María Elena Álvarez Suárez para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de León

León, 2014





## INFORME DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS<sup>1</sup>

El Dr. D. Jesús Ángel Santos Buelga y la Dra. Dña. María Luisa García López, Directores<sup>2</sup> de la Tesis Doctoral titulada “**Caracterización de tipos patógenos de *Escherichia coli* y otros peligros biológicos asociados a la leche de cabra y productos derivados**” realizada por Dña. María Elena Álvarez Suárez en el programa de doctorado Medicina, Sanidad y Producción Animal y Ciencia de los Alimentos, informa favorablemente el depósito de la misma, dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Lo que firman, en León a                    de                    de 2014

---

<sup>1</sup> Solamente para las tesis depositadas en papel.

<sup>2</sup> Si la Tesis está dirigida por más de un Director tienen que constar los datos de cada uno y han de firmar todos ellos.





## ADMISIÓN A TRÁMITE DE LA TESIS DOCTORAL<sup>3</sup>

El órgano responsable del programa de doctorado Medicina, Sanidad y Producción Animal y Ciencia de los Alimentos en su reunión celebrada el día de de ha acordado dar su conformidad a la admisión a trámite de lectura de la Tesis Doctoral titulada “**Caracterización de tipos patógenos de *Escherichia coli* y otros peligros biológicos asociados a la leche de cabra y productos derivados**”, dirigida por el Dr. D. Jesús Ángel Santos Buelga y la Dra. Dña. María Luisa García López, elaborada por Dña. María Elena Álvarez Suárez.y cuyo título en inglés es el siguiente “**Characterization of pathogenic types of *Escherichia coli* and other biological hazards associated with goat's milk and derived products**”.

Lo que firmo, en León a de de 2014.

La Secretaria,

Fdo.: María José Ranilla García

Vº Bº

El Director del Departamento/  
Presidenta de la Comisión Académica,

Fdo.: Teresa María López Díaz

---

<sup>3</sup> Solamente para las tesis depositadas en papel.



## **FINANCIACIÓN.**

Para llevar a cabo esta Tesis Doctoral, la doctoranda fue beneficiaria de una beca enmarcada en el programa de Ayudas para la Formación de Personal Investigador ULE-2009.

Este trabajo se ha financiado con el proyecto AGL2011-26118/ALI del Plan Nacional de Investigación, el proyecto CONSOLIDER – Ingenio 2010: CARNISENUSA (CSD2007-00016) y las ayudas de la Junta de Castilla y León al Grupo de Excelencia GR155



## AGRADECIMIENTOS.

Me gustaría que estas líneas sirvieran para expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas que con su ayuda han colaborado, directa o indirectamente, en la realización de la presente Tesis Doctoral. Posiblemente, con el paso de los años, muchos de los conocimientos adquiridos durante esta etapa investigadora queden en el olvido, pero las experiencias personales que me han enriquecido durante este periodo permanecerán imborrables.

En primer lugar quiero agradecer a mis directores, Dr. Jesús Ángel Santos Buelga y Dra. María Luisa García López, por haber creído en mí y acogerme en su grupo de investigación brindándome siempre su ayuda, apoyo y motivación para que la aventura de mi tesis haya tenido este final. Ha sido un placer y un orgullo ser vuestra discípula.

Quisiera hacer extensiva mi gratitud a todos los miembros del Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos y a todos lo que por él han pasado durante estos años, porque todos, de un modo u otro han contribuido a lograr este éxito. Merecen un especial reconocimiento por el interés mostrado en mi trabajo, las sugerencias científicas aportadas y los buenos ratos compartidos, Andrés, Chema, Bernardo, Chema Fresno, Borja, Luci, Aurelia, Rosa, Araceli, Dolores, Neli y sobre todo “mis chicas”, Luisina, Elsa y Vero.

Otro reconocimiento muy especial merece la comprensión, paciencia y el ánimo recibidos de mi familia y amigos. Por ello agradezco:

A mis padres por apoyarme en todas las decisiones que he tomado a lo largo de la vida, hayan sido buenas o malas, y especialmente por enseñarme a luchar por lo que quiero. A mi hermano, Pablo, a mis abuelos y a mis tíos, porque a pesar de no entender muy bien lo que estaba haciendo ni para qué servía siempre me han animado a continuar y me han regalado todo su cariño.

A mis amigos, que siempre han tenido una palabra de ánimo. Estoy absolutamente convencida de que si de algo puedo presumir en esta vida es de los grandes amigos que tengo, lo que me hace sentir una persona muy afortunada. No

hace falta que los nombre uno a uno, ellos saben quiénes son y lo importantes que son para mí y, aunque algunos están lejos, hacen que me sienta siempre acompañada. Pero no quiero cerrar este párrafo sin destacar a los “bio-amigos” (Marleni, Cris, Yago y Davizín) y a mis AMIGAS, Vero, Lore, Rocío, Verena, Cristinina y Mary, por hacerme sentir que puedo contar con vosotros en cualquier momento ya sea para reír o para llorar y acabar riendo. En vosotros siempre encuentro calma, consejo, confianza, cariño y alegría. Conseguir tiempo para compartirlo juntos siempre ha sido una motivación para continuar trabajando.

A un amigo único, por ser ángel y demonio y hacerme creer que lo esencial es invisible a los ojos.

A los compañeros de carrera que se embarcaron a la par en la aventura de la tesis para prolongar la etapa universitaria, Marta, Sara, Cami, Rubén y Fany porque juntos los comienzos fueron más llevaderos, pero sobre todo a Borja, por ser responsable de que mi proyecto de hacer la tesis llegara a buen puerto, estando a mi lado casi hasta el final, apoyándome en los buenos y malos momentos, y animándome siempre a continuar. Gracias por haberme hecho creer cada día que podía hacerlo.

A los veterinarios (Idoia y Santos) y a los ganaderos que han participado en este estudio, especialmente a Nacho, por hacer más fácil y amena la toma de muestras y por todo lo que me han enseñado sobre la ganadería caprina y sus problemas. A todos ellos mi profundo respeto y reconocimiento.

Y por último, a aquellas personas que han estado presentes en mi camino y, aunque ya no están, han puesto su granito de arena para que hoy sea quién y cómo soy.

"En la Ciencia la única verdad sagrada,  
es que no hay verdades sagradas."

Carl Sagan (1934 – 1996)



***A mi familia.***





**ÍNDICES.**



## ÍNDICE GENERAL.

|  |     |
|--|-----|
| ÍNDICE GENERAL. ....   | I   |
| ÍNDICE DE TABLAS. ....   | VII |
| ÍNDICE DE FIGURAS.....   | X   |
| JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.   |     |
| INTRODUCCIÓN.....  | 1   |
| Importancia del sector caprino. ....   | 1   |
| Consumo de leche de cabra y sus derivados. ....  | 2   |
| Características y composición de la leche de cabra.....  | 4   |
| Microbiología de la leche. ....  | 7   |
| Importancia de la presencia de microorganismos patógenos humanos en alimentos.....                                 | 8   |
| Tipificación de los microorganismos. ....  | 11  |
| OBJETIVOS.....   | 12  |
| BIBLIOGRAFÍA.....  | 13  |
| CAPÍTULO I. CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE LA LECHE DE CABRA, CON ATENCIÓN A LA PRESENCIA DE MICROORGANISMOS PATÓGENOS. |     |
| INTRODUCCIÓN.....  | 17  |
| Implicación de la leche y sus derivados en enfermedades de transmisión alimentaria. ....                           | 17  |
| Características de los microorganismos seleccionados para este trabajo. ....                                       | 19  |
| Biología de <i>C. sakazakii</i> .....  | 19  |
| MATERIAL Y MÉTODOS.....  | 21  |
| 1.- Toma de muestras.....  | 21  |
| 2.- Procesado de las muestras de leche.....  | 23  |
| 2.1.- Recuento de microorganismos mesófilos viables. ....  | 23  |

|   |    |
|---|----|
| 2.2.- Aislamiento de <i>Cronobacter sakazakii</i> ( <i>C. sakazakii</i> ).....          | 23 |
| 2.2.1.- Enriquecimiento no selectivo.....   | 23 |
| 2.2.2.- Enriquecimiento selectivo y aislamiento.....                                    | 24 |
| 2.2.3.- PCR de los enriquecimientos.....  | 24 |
| 2.3.- Aislamiento de <i>Staphylococcus aureus</i> ( <i>S. aureus</i> ).....             | 26 |
| 2.3.1.- Aislamiento selectivo.....  | 26 |
| 2.3.2.- Recuento.....   | 27 |
| 2.3.3.- Conservación de las cepas.....  | 27 |
| 2.4.- Aislamiento de tipos patógenos de <i>Escherichia coli</i> ( <i>E. coli</i> )..... | 27 |
| 2.4.1.- Enriquecimiento no selectivo de las muestras.....                               | 27 |
| 2.4.2.- PCR de los enriquecimientos no selectivos.....                                  | 28 |
| 2.4.3.- Aislamiento selectivo y conservación de las cepas.....                          | 29 |
| 3.- Procesado de muestras ambientales.....  | 30 |
| 3.1.- Aislamiento de <i>Escherichia coli</i> ( <i>E. coli</i> ).....                    | 30 |
| 3.1.1.- Enriquecimiento no selectivo de las muestras.....                               | 30 |
| 4.- Procesado de muestras clínicas.....   | 31 |
| 4.1.- Aislamiento de <i>Escherichia coli</i> ( <i>E. coli</i> ).....                    | 31 |
| 4.1.1.- Enriquecimiento no selectivo de las muestras.....                               | 31 |
| RESULTADOS.....   | 32 |
| 1.- Recuento de microorganismos mesófilos viales.....                                   | 32 |
| 2.- Incidencia de <i>Cronobacter sakazakii</i> .....                                    | 34 |
| 3.- Recuento y aislamiento de <i>Staphylococcus aureus</i> .....                        | 34 |
| 4.- Incidencia de <i>Escherichia coli</i> .....   | 36 |
| DISCUSIÓN.....  | 39 |
| BIBLIOGRAFÍA.....   | 44 |

## CAPÍTULO II. CARACTERIZACIÓN DE *S. aureus*.

|  |    |
|--|----|
| INTRODUCCIÓN.....  | 51 |
| Biología de <i>S. aureus</i> . ....  | 51 |
| Caracterización molecular.....   | 53 |
| MATERIAL Y MÉTODOS.....  | 55 |
| 1.- Microorganismos. ....  | 55 |
| 2.- Extracción de ADN.....   | 56 |
| 3.-PCR. ....   | 57 |
| 4.- Prueba de la coagulasa. ....   | 58 |
| 5.- Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción amplificados mediante PCR (PCR-RFLP)..... | 59 |
| 6.- Electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE). ....  | 61 |
| 7.- Formación de biofilm. ....   | 63 |
| RESULTADOS.....  | 64 |
| 1.-PCR. ....   | 64 |
| 2.- Prueba de la coagulasa. ....   | 65 |
| 3.- Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción amplificados mediante PCR (PCR-RFLP)..... | 65 |
| 4.- Electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE). ....  | 68 |
| 5.- Formación de biofilm. ....   | 70 |
| DISCUSIÓN. ....  | 70 |
| BIBLIOGRAFÍA.....  | 74 |

## CAPÍTULO III. CARACTERIZACIÓN DE *E. coli*.

|   |    |
|---|----|
| INTRODUCCIÓN.....   | 81 |
| Biología de <i>E. coli</i> .....                                    | 81 |
| Importancia de los alimentos en la transmisión de EPEC y STEC. .... | 88 |

|  |     |
|--|-----|
| Caracterización molecular.....   | 90  |
| Tipificación Multilocus de Secuencias (MLST).....  | 901 |
| MATERIAL Y MÉTODOS.....  | 91  |
| 1.- Microorganismos.....   | 91  |
| 2.- Detección de plásmidos en <i>E. coli</i> .....   | 92  |
| 3.- Detección de genes de patogenicidad mediante PCR.....                                      | 93  |
| 4.- Determinación de grupos filogenéticos de <i>E. coli</i> .....                              | 95  |
| 5.- Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE).....   | 96  |
| 6.- Tipificación Multilocus de Secuencias (MLST) y análisis filogenético.....                  | 99  |
| 7.- Dry SPOT <i>E. coli</i> O157 latex test.....   | 102 |
| 8.- Serotipado de <i>E. coli</i> .....   | 103 |
| 9.- Metabolismo de carbohidratos.....  | 103 |
| RESULTADOS.....  | 106 |
| 1.- Detección de plásmidos y genes asociados a los mismos en <i>E. coli</i> .....              | 106 |
| 2.- Detección de genes de patogenicidad mediante PCR.....                                      | 107 |
| 3.- Determinación de grupos filogenéticos de <i>E. coli</i> .....                              | 109 |
| 4.- Electroforesis en Gel de Campo Pulsado.....  | 111 |
| 5.- Tipificación Multilocus de Secuencias (MLST) y análisis filogenético.....                  | 113 |
| 6.- Dry SPOT <i>E. coli</i> O157 latex test.....   | 120 |
| 7.- Serotipado.....  | 120 |
| 8.- Metabolismo de carbohidratos.....  | 122 |
| DISCUSIÓN.....   | 124 |
| BIBLIOGRAFÍA.....  | 131 |
| CAPÍTULO IV. PRUEBAS DE COMPORTAMIENTO DE EPEC Y STEC EN LECHE DE CABRA Y PRODUCTOS DERIVADOS. |     |
| INTRODUCCIÓN.....  | 139 |

|  |     |
|--|-----|
| Influencia de la temperatura en la proliferación de las bacterias en la leche.....   | 139 |
| Influencia del pH en la proliferación de las bacterias en la leche.....  | 141 |
| Influencia de la actividad de agua en la proliferación de las bacterias en la leche.<br>.....  | 142 |
| Cuajada.....   | 142 |
| Yogurt. ....   | 143 |
| MATERIAL Y MÉTODOS. ....   | 145 |
| 1. - Microorganismos. ....   | 145 |
| 2.- Comportamiento de cepas EPEC a baja temperatura y estudio de la<br>temperatura mínima de crecimiento.....                            | 145 |
| 3. – Resistencia a la acidez. ....   | 146 |
| 3.1. – Elección de la concentración máxima de cada ácido a utilizar.....   | 146 |
| 3.2. – Tolerancia de las cepas de <i>E. coli</i> EPEC a una concentración de ácido<br>láctico 3,43 M o de ácido clorhídrico 3,37 M. .... | 147 |
| 3.3. – Tolerancia de las cepas de <i>E. coli</i> STEC a una concentración de ácido<br>láctico 3,43 M o de ácido clorhídrico 3,37 M. .... | 148 |
| 4.- Influencia de la actividad de agua, y del soluto empleado para modificarla, en el<br>crecimiento de cepas EPEC. ....                 | 148 |
| 5.- Evaluación del comportamiento de cepas STEC y EPEC en la cuajada. ....   | 149 |
| 6.- Evaluación del comportamiento de cepas STEC y EPEC en yogurt.....  | 151 |
| RESULTADOS. ....   | 153 |
| 1.- Comportamiento de cepas EPEC a baja temperatura y estudio de la<br>temperatura mínima de crecimiento.....                            | 153 |
| 2.- Resistencia a la acidez.....   | 154 |
| 2.1.- Tolerancia de cepas de <i>E. coli</i> EPEC y STEC a distintas concentraciones de<br>ácido láctico y ácido clorhídrico.....         | 154 |

|  |     |
|--|-----|
| 2.2.- Tolerancia de cepas de E. coli EPEC y STEC a una concentración de ácido láctico de 3,34 M y de ácido clorhídrico 3,37..... | 157 |
| 2.3.- Tolerancia de cepas de E. coli EPEC y STEC a una concentración de ácido láctico de 3,34 M y de ácido clorhídrico 3,37..... | 158 |
| 3 - Influencia de la actividad de agua, y del soluto empleando para modificarla, en el crecimiento de cepas EPEC. ....           | 159 |
| 4 - Evaluación del comportamiento de STEC y EPEC en cuajada. ....  | 160 |
| 5 - Evaluación del comportamiento de STEC y EPEC en yogurt.....  | 162 |
| DISCUSIÓN. ....  | 164 |
| BIBLIOGRAFÍA.....  | 168 |
| CONCLUSIONES.....  | 173 |

## ÍNDICE DE TABLAS.

### JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.

|   |   |
|---|---|
| Tabla 1. Serie histórica de la producción, consumo, precio y valor de la leche de cabra (MAGRAMA, 2012a). ..... | 3 |
| Tabla2. Características físicas de la leche (Goursaud J., 1991). .....  | 4 |
| Tabla 3. Composición química de la leche (Goursaud J., 1991).....   | 5 |

### CAPÍTULO I. CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE LA LECHE DE CABRA, CON ATENCIÓN A LA PRESENCIA DE MICROORGANISMOS PATÓGENOS.

|   |    |
|---|----|
| Tabla I.1. Cebadores empleados en la amplificación del gen <i>ompA</i> de <i>C. sakazakii</i> . .....   | 25 |
| Tabla I.2. Cebadores empleados en la amplificación de los genes <i>stx1</i> , <i>stx2</i> y <i>eae</i> de <i>E. coli</i> . .....  | 28 |
| Tabla I.3. Selección de valores estadísticos del recuento en placas estándar de microorganismos mesófilos detectados en muestras de leche de tanque de explotaciones caprinas y puntos de descarga.....   | 32 |
| Tabla I.4. Distribución en función de los límites legales establecidos en el Reglamento (CE) 853/2004 (Parlamento Europeo, 2004) de los recuentos de microorganismos mesófilos obtenidos en las distintas explotaciones. Media aritmética (MA) y media geométrica (MG) de los valores obtenidos en los recuentos..... | 33 |
| Tabla I.5. Recuento de <i>S. aureus</i> presentes en muestras de leche de tanque procedente de explotaciones caprinas. ....   | 35 |
| Tabla I.6. Distribución de los enriquecimientos con detección únicamente del gen <i>eae</i> . .....   | 36 |
| Tabla I.7. Distribución de los enriquecimientos con presencia de algún gen <i>stx</i> . ..  | 37 |
| Tabla I.8. Distribución de las cepas de EPEC aisladas en los distintos tipos de muestras analizadas. ....   | 38 |
| Tabla I.9. Distribución de las cepas STEC aisladas en los distintos tipos de muestras analizadas y de los genes que contiene cada una de ellas. ....  | 38 |

## CAPÍTULO II. CARACTERIZACIÓN DE *S. aureus*.

|  |    |
|--|----|
| Tabla II.1. Cepas de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) empleadas como controles positivos en las reacciones de PCR. ....   | 56 |
| Tabla II.2. Cebadores empleados en la amplificación de diversos genes de <i>S. aureus</i> ( <i>coa</i> , <i>icaA</i> , <i>bap</i> , <i>mecA</i> , y los que codifican para las enterotoxinas)..... | 57 |
| Tabla II.3. Relación de cepas de <i>S. aureus</i> asignadas a cada grado de coagulación según la prueba de coagulasa en tubo. ....   | 65 |

## CAPÍTULO III. CARACTERIZACIÓN DE *E. coli*.

|  |     |
|--|-----|
| Tabla III.1. . Cepas de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) y de la Colección Sueca (CCUG) empleadas como controles positivos en las reacciones de PCR. ....   | 92  |
| Tabla III.2. Cebadores empleados en la amplificación de diversos genes asociados a la patogenicidad de <i>E. coli</i> . ....   | 81  |
| Tabla III.3. Cebadores empleados en la amplificación de los genes que permiten establecer una clasificación filogenética de <i>E. coli</i> . ....  | 88  |
| Tabla III.4. Cebadores empleados en la amplificación de genes <i>housekeeping</i> recomendados por EcMLST.....   | 100 |
| Tabla III.5. Relación de carbohidratos presentes en la galería API 50 CH. ....   | 104 |
| Tabla III.6. Resultados de las PCRs llevadas a cabo para detectar la presencia de distintos genes codificados en la isla de patogenicidad LEE. Los colores mostrados en ella son equivalentes a los de la representación gráfica de los distintos patrones mostrados en la figura III.5..... | 108 |
| Tabla III.7. Distribución de las cepas estudiadas en cada grupo filogenético.....  | 110 |
| Tabla III.8. Resumen del análisis MLST de 54 cepas de <i>E. coli</i> atendiendo a 7 genes <i>housekeeping</i> . En rojo se marcan tanto los nuevos alelos como los nuevos ST detectados.....   | 114 |
| Tabla III.9. Resumen del análisis MLST de 38 cepas de <i>E. coli</i> atendiendo a 8 genes <i>housekeeping</i> . ....   | 117 |

|  |     |
|--|-----|
| Tabla III.10. Resumen del análisis MLST de 27 cepas de <i>E. coli</i> atendiendo a 5 genes <i>housekeeping</i> ..... | 118 |
|--|-----|

|  |     |
|--|-----|
| Tabla III.11. Relación de serotipos asignados a cada cepa EPEC.. | 121 |
|--|-----|

|   |     |
|---|-----|
| Tabla III.12. Relación de serotipos asignados a cada cepa STEC..... | 122 |
|---|-----|

#### CAPÍTULO IV. PRUEBAS DE COMPORTAMIENTO DE CEPAS EPEC Y STEC EN LECHE DE CABRA Y PRODUCTOS DERIVADOS.

|   |     |
|---|-----|
| Tabla IV.1. Condiciones finales de los medios preparados con diversas concentraciones de ácido láctico..... | 146 |
|---|-----|

|   |     |
|---|-----|
| Tabla IV.2. Condiciones finales de los medios preparados con diversas concentraciones de ácido clorhídrico..... | 147 |
|---|-----|

|  |     |
|--|-----|
| Tabla IV.3. Actividad de agua de los medios en función de la concentración de cada soluto..... | 149 |
|--|-----|

|  |     |
|--|-----|
| Tabla IV.4. Valores medios de absorbancia a 450 nm que presentaban tres cultivos de cepas EPEC (L6, L29a y L50) tras 24 horas de incubación en caldo TSB con distintas concentraciones de ácido láctico..... | 155 |
|--|-----|

|  |     |
|--|-----|
| Tabla IV.5. Valores medios de absorbancia a 450 nm que presentaban tres cultivos de cepas STEC (L10, L22 y L24) tras 24 horas de incubación en caldo TSB con distintas concentraciones de ácido láctico..... | 156 |
|--|-----|

|   |     |
|---|-----|
| Tabla IV.6. Valores medios de absorbancia a 450 nm que presentaba la cepa EPEC L6 tras 24 horas de crecimiento en presencia de distintas concentraciones ácido clorhídrico..... | 157 |
|---|-----|

|   |     |
|---|-----|
| Tabla IV.7. Valores de absorbancia referentes a cepas EPEC incubadas en presencia de ácido láctico..... | 158 |
|---|-----|

|   |     |
|---|-----|
| Tabla IV.8. Valores de absorbancia referentes a cepas EPEC incubadas en presencia de ácido clorhídrico..... | 158 |
|---|-----|

|   |     |
|---|-----|
| Tabla IV.9. Valores de absorbancia referentes a cepas STEC incubadas en presencia de ácido láctico..... | 159 |
|---|-----|

|  |     |
|--|-----|
| Tabla IV.10. Valores de absorbancia referentes a cepas STEC incubadas en presencia de ácido clorhídrico..... | 159 |
|--|-----|

## ÍNDICE DE FIGURAS.

### JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.

|   |   |
|---|---|
| Figura 1. Evolución de la serie histórica de producción láctea (MAGRAMA, 2012a).<br>..... | 2 |
|---|---|

### CAPÍTULO I. CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE LA LECHE DE CABRA, CON ATENCIÓN A LA PRESENCIA DE MICROORGANISMOS PATÓGENOS.

|  |    |
|--|----|
| Figura I.1. Tipos de muestras recogidas en las distintas explotaciones. De izquierda a derecha: aire (muestreador), leche, pienso, agua y heces en suelo.....  | 22 |
| Figura I.2. Esquema de aislamiento de <i>Cronobacter sakazakii</i> .....   | 24 |
| Figura I.3. Frecuencia de distribución del recuento en placa de microorganismos mesófilos detectados en muestras de leche de tanque de explotaciones caprinas y puntos de descarga. En el eje de abscisas se representan los intervalos..... | 33 |

### CAPÍTULO II. CARACTERIZACIÓN DE *S. aureus*.

|  |    |
|--|----|
| Figura II.1. Polimorfismo del gen de la coagulasa de <i>S. aureus</i> . ....   | 64 |
| Figura II.2. Patrones de bandas obtenidos tras la restricción del gen de la coagulasa de <i>S. aureus</i> con endonucleasa <i>HhaI</i> . ....                      | 66 |
| Figura II.3. Distribución de los patrones de restricción generados tras digerir el gen de la coagulasa de <i>S. aureus</i> con la endonucleasa <i>HhaI</i> .....   | 66 |
| Figura II.4. Dendrograma resultado de la técnica RFLP para el gen de la coagulasa de las cepas de <i>S. aureus</i> aisladas de leche y explotaciones caprinas..... | 67 |
| Figura II.5. Dendrograma resultado de la realización de la técnica PFGE sobre las cepas de <i>S. aureus</i> aisladas de leche y explotaciones caprinas.....        | 69 |

### CAPÍTULO III. CARACTERIZACIÓN DE *E. coli*.

|  |     |
|--|-----|
| Figura III.1. Esquema patogénico de cepas de <i>E. coli</i> diarreagénicas (Kaper et al., 2004).....   | 82  |
| Figura III.2. Imagen de las tarjetas utilizadas para la realización de la prueba Dryspot <i>E. coli</i> O157 test. (1) Pruebas sin utilizar. (2) Resultado negativo. (3) Resultado positivo..... | 102 |

|   |     |
|---|-----|
| Figura III.3. Galería API 50 CH inoculada antes de la incubación (A) y después, tras producirse la fermentación de algunos carbohidratos (B). .....   | 105 |
| Figura III.4. Resultado de la PCR de amplificación del gen <i>bfpA</i> . .....  | 106 |
| Figura III.5. Representación gráfica del número de aislados correspondientes a cada patrón de genes codificados en la isla de patogenicidad LEE obtenidos. ....   | 109 |
| Figura III.6. Distribución de los grupos filogenéticos de <i>E. coli</i> . .....  | 110 |
| Figura III.7. Dendrograma resultado de la realización de la técnica PFGE sobre las cepas de <i>E. coli</i> aisladas de leche y explotaciones caprinas (... EPEC/STEC) y de muestras clínicas (EPEC/STEC –C...). ..... | 112 |
| Figura III.8. Representación gráfica del análisis eBurst para 7 genes del principal grupo clonal encontrado entre las cepas de <i>E. coli</i> estudiadas. ....  | 115 |
| Figura III.9. Árbol representativo de las distancias relativas entre los distintos perfiles alélicos obtenidos tras analizar 7 genes en las cepas de <i>E. coli</i> estudiadas. ....                                  | 115 |
| Figura III.10. Análisis filogenético de las secuencias concatenadas de los 7 genes estudiados en cepas de <i>E. coli</i> aisladas de muestra de leche y de muestras tomadas en explotaciones caprinas. ....           | 116 |
| Figura III.11. Árbol representativo de las distancias relativas entre los distintos perfiles alélicos obtenidos tras analizar 8 genes MLST en cepas EPEC. ....  | 117 |
| Figura III.12. Análisis filogenético de las secuencias concatenadas de los 8 genes MLST estudiados en cepas de EPEC. ....   | 118 |
| Figura III.13. Árbol representativo de las distancias relativas entre los distintos perfiles alélicos obtenidos tras analizar 5 genes MLST en cepas STEC. ....  | 119 |
| Figura III.14. Análisis filogenético de las secuencias concatenadas de los 5 genes MLST estudiados en cepas de STEC. ....   | 119 |
| Figura III.15. Correlación existente entre las cepas EPEC y STEC estudiadas atendiendo a la utilización de carbohidratos. ....  | 123 |

CAPÍTULO IV. PRUEBAS DE COMPORTAMIENTO DE EPEC Y STEC EN LECHE DE CABRA Y PRODUCTOS DERIVADOS.

|   |     |
|---|-----|
| Figura IV.1. Elaboración del yogurt. ....   | 152 |
| Figura IV.2. Comportamiento de tres cepas EPEC (L6, L29a y L50) incubadas en dos caldos de cultivo distintos, leche de cabra UHT (A) y TSB (B).....                             | 153 |
| Figura IV.3. Representación gráfica de la tolerancia de tres cepas EPEC (L6, L29a y L50) a distintas concentraciones de ácido láctico.....                                      | 155 |
| Figura IV.4. Representación gráfica de la tolerancia de tres cepas STEC (L10, L22 y L24) a distintas concentraciones de ácido láctico.....                                      | 156 |
| Figura IV.5. Comportamiento de cepas EPEC en un medio con distintos valores de $a_w$ obtenidos mediante adición de diferentes concentraciones de NaCl, glicerol y sacarosa..... | 160 |
| Figura IV.6. Evolución del desarrollo de cepas de <i>E. coli</i> EPEC y STEC en cuajada durante el periodo de almacenamiento en condiciones de refrigeración.. .....            | 161 |
| Figura IV.7. Evolución del pH de la cuajada durante el periodo de almacenamiento en condiciones de refrigeración.....   | 162 |
| Figura IV.8. Evolución del desarrollo de cepas de <i>E. coli</i> EPEC y STEC en yogurt durante el periodo de almacenamiento en condiciones de refrigeración. ....               | 163 |
| Figura IV.9. Evolución del pH del yogurt durante el periodo de almacenamiento en condiciones de refrigeración.....  | 163 |
| Figura IV.10. Evolución de la acidez titulable del yogurt durante el periodo de almacenamiento en condiciones de refrigeración.....   | 164 |



**JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.**



## **INTRODUCCIÓN.**

### **Importancia del sector caprino.**

El sector caprino es uno de los sectores de producción primaria que más ha evolucionado en los últimos años, tanto en el ámbito de la producción como en el de la comercialización. Según datos de 2012 del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA, 2012b), la cabaña caprina en España, con casi 3 millones de cabezas, es la segunda en importancia en la UE, tras Grecia, en cuanto a producción cárnica y la tercera en producción de leche después de Francia y Grecia, localizándose aproximadamente el 5% de esta cabaña en Castilla y León. La mayoría de las explotaciones de caprino se dedican a la producción cárnica, pero según los datos provisionales proporcionados por SITRAN (Sistema Integral de Trazabilidad Animal), a fecha 1 de enero de 2013, el número de explotaciones de caprino mixtas, es decir de producción cárnica y lechera, ha aumentado un 6,6% respecto a los datos del 2012. En cuanto al volumen de producción de leche de cabra en España se ha observado una disminución desde el año 2009 hasta ahora, pero aun así supone una cifra significativa dentro de la Unión Europea, con 464 millones de litros anuales, de los cuales, aproximadamente 30 millones se producen en Castilla y León. La producción media anual de leche por cabra lechera productiva puede estimarse en 250- 260 litros, valor próximo al obtenido en Italia, y superior al de Grecia, pero aproximadamente la mitad del logrado en Francia debido a las razas mayoritarias en cada país. En Francia predomina la raza alpina o pirenaica de mayor aptitud lechera (entre 4 y 4,5 litros al día) frente a la raza murciano-granadina que es la dominante en España con un rendimiento lechero de entre 3-4 litros al día. (MURCIGRAN & MAGRAMA, 2012). La producción anual de leche de cabra en nuestro país se estima que es de 464 millones de litros, y junto con la leche de oveja supone un 15 % de la Renta Láctea y un 6,3 % del valor total del sector agrario, lo que se traduce en 411 millones de euros anuales (MAGRAMA, 2012b).

## Consumo de leche de cabra y sus derivados.

La leche de cabra constituye una de las características diferenciales de la alimentación en los países de la cuenca mediterránea, además de ser la leche que tradicionalmente se les ha dado a los bebés y niños que no podían tomar leche materna y tampoco toleraban la leche de vaca; sin embargo, su consumo a comienzos del siglo XX comenzó a disminuir siendo sustituida por la leche de vaca, cuya explotación es más sencilla. Actualmente parece que esta tendencia está cambiando y en los últimos años ha aumentado notablemente la demanda de la leche de cabra utilizada para la transformación en queso, para el consumo de leche UHT o para la elaboración de leche infantiles, con destino a países europeos como Francia, Italia, Bélgica, Holanda o Portugal lo que supone una garantía de estabilidad y una oportunidad para la producción nacional, además otros tipos de productos derivados de la leche de cabra como son la cuajada, la nata o la leche en polvo destinados a países como Nueva Zelanda o países orientales han motivado un nuevo impulso de la demanda que actualmente está consiguiendo volver a situar la leche de cabra en un lugar privilegiado. En este sentido comprobamos como los precios de la leche de cabra se han incrementado notablemente en 2012 superando incluso a los precios de la leche de oveja y ésta tendencia se ha mantenido a lo largo del 2013 (<http://www.agropalsc.com/quesoscerrato/templatesnews.shtml?idboletin=2440&idseccion=13963&idarticulo=118245#.UycuNfl5NyU>).

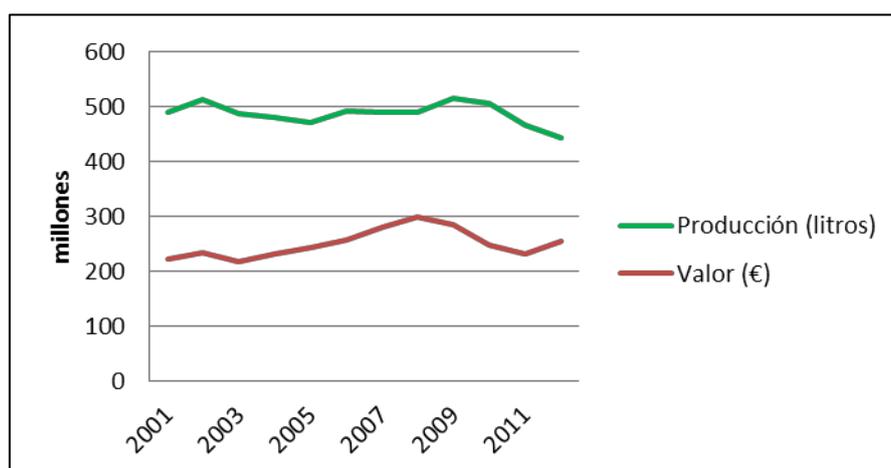


Figura 1. Evolución de la serie histórica de producción láctea (MAGRAMA, 2012a).

Tabla 1. Serie histórica de la producción, consumo, precio y valor de la leche de cabra (MAGRAMA, 2012a).

| Años | Producción total (millones de litros) | Consumo humano (millones de litros) | Consumo industrial (millones de litros) | Precio medio percibido por los ganaderos (euros/100 litros) | Valor (miles de euros) |
|------|---------------------------------------|-------------------------------------|---|---|------------------------|
| 2001 | 488,7                                 | 15,5                                | 473,2                                   | 45,65   | 223106                 |
| 2002 | 513,1                                 | 17,6                                | 495,5                                   | 45,76   | 234802                 |
| 2003 | 486,8                                 | 11,9                                | 474,9                                   | 44,88   | 218491                 |
| 2004 | 479,4                                 | 11,8                                | 467,6                                   | 48,34   | 231722                 |
| 2005 | 471,9                                 | 12,3                                | 459,6                                   | 51,63   | 243630                 |
| 2006 | 491,7                                 | 13,1                                | 478,7                                   | 52,60   | 258653                 |
| 2007 | 488,7                                 | 12,3                                | 476,4                                   | 57,31   | 280100                 |
| 2008 | 490,7                                 | 7,7                                 | 483,0                                   | 60,97   | 299169                 |
| 2009 | 514,7                                 | 65,3                                | 449,5                                   | 55,39   | 285113                 |
| 2010 | 506,6                                 | 63,3                                | 443,4                                   | 48,99   | 248183                 |
| 2011 | 466,7                                 | 70,4                                | 397,5                                   | 50,13   | 233958                 |
| 2012 | 443,6                                 | 60,5                                | 383,1                                   | 57,47   | 254951                 |

En nuestro país la mayor parte de la producción de leche de cabra (> 80 %) se dedica a la fabricación de queso y en menor medida de yogurt. El consumo de queso total en España es de unos 8 kg por habitante y año, y el de cabra, aunque ha aumentado ostensiblemente en los últimos años, es todavía muy bajo (0,37 kg por habitante y año), pudiendo ampliarse en el futuro su segmento de mercado (Anónimo, ; MAGRAMA, 2013) (<http://www.magrama.gob.es/en/ministerio/servicios/informacion/plataforma-de-conocimiento-para-el-medio-rural-y-pesquero/observatorio-de-tecnologias-probadas/sistemas-prodnut-animal/ganado-caprino.aspx>).

---

## Características y composición de la leche de cabra.

La leche es una mezcla de sustancias definidas (glúcidos, lípidos, proteínas, sales, enzimas y vitaminas) y presenta unas determinadas características físicas que varían en función la especie animal.

Las características físicas más comunes de la leche se resumen en los siguientes párrafos (Goursaud J., 1991).

Tabla2. Características físicas de la leche.

| Constantes                 | Valores          |
|----------------------------|------------------|
| pH (20 °C)                 | 6,5 a 6,7        |
| Acidez valorable           | 15 a 18 °D       |
| Densidad                   | 1,028 a 1,036    |
| Temperatura de congelación | -0,51 a -0,55 °C |

La medida del pH nos proporciona información sobre el estado de frescura de la leche. La leche fresca normalmente es neutra o ligeramente ácida. En el caso de que se observe una acidificación de la leche nos indica que han actuado las bacterias lácticas y una alcalinización de la leche nos indica que el individuo tiene mamitis.

La acidez valorable, expresada en grados DORNIC (°D) (1 grado DORNIC equivale a 0,1 g de ácido láctico por litro de leche), nos proporciona información indirecta sobre la riqueza en materia seca, basándose en la acidez natural de la leche.

La densidad es otro parámetro que también se relaciona con la riqueza en materia seca. Una leche enriquecida con materia grasa presenta una densidad menor que una leche desnatada, ya que la materia grasa posee una densidad menor de 1 (0,93 a 20 °C).

La temperatura de congelación varía dentro de unos límites, pero su medida nos permite apreciar la cantidad de agua añadida eventualmente a la leche.

La composición química general de la leche se resume en la tabla 3.

Tabla 3. Composición química de la leche.

| <b>COMPONENTE</b>   | <b>g/l</b>           |
|---|----------------------|
| <b>Agua</b>   | 902                  |
| <b>Glúcidos</b>   | 40 - 60              |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Lactosa</b></li> </ul>  |                      |
| <b>Materia grasa</b>  |                      |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Lípidos</b></li> <li>• <b>Fosfolípidos</b></li> <li>• <b>Compuestos liposolubles</b></li> </ul> | 25 - 45              |
| <b>Materia nitrogenada</b>  |                      |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Proteínas (caseínas, proteínas solubles)</b></li> <li>• <b>Materia no proteica</b></li> </ul>   | 25 - 40              |
| <b>Sales</b>  | 7 – 10               |
| <b>Catalizadores (vitaminas, enzimas)</b>   | Trazas               |
| <b>Gas disuelto (CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>)</b>  | 5 % volumen de leche |

Las diferentes especies de mamíferos producen leches con una composición semejante en líneas generales, pero pequeñas variaciones de los componentes le confieren propiedades muy diferentes. Dentro de la leche de cabra existen diferencias en función de la raza, del estado de lactación, de la alimentación y de las condiciones ambientales en las que se encuentren los animales, pero básicamente la leche de cabra se caracteriza por contener proteínas que el ser humano digiere y tolera mejor que las de otros rumiantes. El bajo contenido en caseínas  $\alpha_{s1}$  explica la fácil digestión de este alimento, y la mejor tolerancia de esta leche se ha observado en numerosos estudios en los que se ha comprobado que el suministro de leche de cabra reduce considerablemente las reacciones alérgicas a la leche, sobre todo en edad infantil, ya que esta leche se parece más a la leche humana que la de vaca. La cantidad de proteína en esta leche varía en función de la raza y va desde 2,6 g/l a 4,1 g/l, pero también pueden influir otros factores como son el estado de lactación, la estación, la edad y la alimentación (Raynal-Ljutovac et al., 2008). En cuanto a la composición media de aminoácidos esenciales se ha visto que la leche de cabra contiene mayor

---

concentración de 6 de los 10 principales: treonina, isoleucina, lisina, cisteína, tirosina y valina, respecto a la leche de vaca (Haenlein, 2004).

Los ácidos grasos presentes en la leche de cabra también se caracterizan por ser fácilmente digeribles ya que están formados principalmente por ácidos de cadena corta (C3-C5) y cadena media (C6-C14). Estos ácidos grasos presentan un metabolismo distinto al de los ácidos grasos de cadena larga y se pueden absorber directamente en el intestino, sin necesidad de que ocurra una esterificación, llegando rápidamente a través de la vía sanguínea al hígado para ser oxidados y suponer de este modo un aporte rápido de energía. Otra característica de los ácidos grasos presentes en la leche de cabra es el pequeño tamaño de los glóbulos de grasa, que también puede ser uno de los factores que contribuyen a facilitar la digestión (Raynal-Ljutovac et al., 2008).

Desde el punto de vista de la composición mineral y su aprovechamiento por el organismo se ha visto que es una leche de mayor calidad que la de vaca. Se caracteriza por su alto contenido en cloro y potasio, y los niveles de calcio, fósforo, magnesio, hierro y cobre también son mayores respecto a los encontrados en leche de vaca (Raynal-Ljutovac et al., 2008).

Todas estas pequeñas diferencias en la composición de la leche de cabra frente a la leche de vaca hacen que esta leche se emplee cada vez con más frecuencia para el consumo humano, sobre todo para alimentación de niños, siendo especialmente indicada para tratar algunos casos de malnutrición, para tratar enfermedades o trastornos gastrointestinales, como sustituto de la leche de vaca en el caso de ésta induzca reacciones alérgicas, o incluso para reducir los niveles de colesterol (Haenlein, 2004; Sanz-Ceballos et al., 2009) aunque según la EFSA los estudios realizados hasta el momento no son suficientes para afirmar estas propiedades que se le atribuye (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA), 2012).

## Microbiología de la leche.

Un aspecto importante en la producción de leche de cabra y alimentos derivados es la calidad higiénica de los mismos. La compleja composición bioquímica de la leche y su alto contenido en agua hacen de la leche un buen sustrato para el crecimiento de microorganismos tanto inocuos como patógenos. La leche contiene microorganismos (bacterias, levaduras y mohos) que no influyen en la salud humana, pero son un buen indicador de la higiene en el ordeño y en la posterior conservación de la leche. Además estos microorganismos se han estudiado por su utilidad y capacidad para alterar tanto la composición como las características de la leche. Sin embargo, ésta se puede contaminar fácilmente con microorganismos patógenos o sus toxinas y provocar enfermedades en el consumidor (Chambers J., 2002; International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF), 1998).

El número y el tipo de microorganismos que se encuentran en la leche inmediatamente después del ordeño reflejan la contaminación microbiana durante la producción, ordeño y manipulación. La temperatura de almacenamiento y transporte de la leche es muy importante a la hora de conservar las condiciones higiénicas de la misma, ya que temperaturas superiores a 6 °C en cualquiera de los pasos inducen un aumento de la microbiota que puede enmascarar posibles problemas sanitarios. El recuento de bacterias mesófilas en la leche cruda supone un buen indicador para monitorizar las condiciones higiénicas de ésta durante la producción, ordeño y manipulación, y se lleva a cabo mediante siembra directa en agar seguido de una incubación aerobia a 30 °C durante 3 días, realizándose el muestreo durante un periodo de dos meses, con un número mínimo de dos muestras al mes (Parlamento Europeo, 2004). A pesar de ser un método muy utilizado, no sirve para indicar la fuente de contaminación bacteriana ni para la identificación de las deficiencias en la cadena de producción que originan los altos recuentos. Otro método ampliamente utilizado para detectar infecciones intramamarias en pequeños rumiantes es el recuento de células somáticas (SCC), sin embargo, diversos estudios apuntan que en cabra no es un método muy válido puesto que los recuentos fluctúan mucho, incluso de un día para otro, debido a fenómenos ajenos a infecciones intramamarias (EFSA, 2005).

---

Los principales grupos de microorganismos que podemos encontrar como contaminantes de la leche son bacterias lácticas, micrococos, estafilococos, y otras bacterias gram positivas esporuladas y no esporuladas, así como bacterias gram negativas, principalmente enterobacterias, pseudomonas, acromobacterias, micobacterias, además de mohos y levaduras. El origen de la contaminación por estos microorganismos es muy diverso, hay que buscarlo en el ordeño, en el medio ambiente, en la limpieza del animal, en la limpieza y salud del personal que trabaja en la explotación, en la limpieza de los equipos y utensilios utilizados en el proceso de ordeño y almacenamiento de la leche, e incluso en la calidad del agua empleada para ello (Chambers J., 2002).

## **Importancia de la presencia de microorganismos patógenos humanos en alimentos.**

Antes de la segunda Guerra Mundial, el consumo de leche o nata no pasteurizadas causaba con frecuencia brotes de enfermedades como la difteria, la poliomielitis, el tifus o la tuberculosis. En la actualidad, las mejoras introducidas en la higienización a nivel de las explotaciones agrarias y plantas de procesado, junto con la aplicación rutinaria de la pasteurización de la leche, han eliminado prácticamente el riesgo de transmisión de estas enfermedades. Sin embargo aún existen otras bacterias patógenas humanas que se pueden encontrar en la leche, y cuyas principales vías de contaminación son, a través del canal del pezón para acceder al interior de la mama, como es el caso de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp. y coliformes que se adhieren a la ubre y tras el ordeño penetran en el interior, y por contaminación “endógena” como es el caso de *Salmonella*, *Brucella* y *Mycobacterium tuberculosis*. Estos microorganismos producen enfermedades sistémicas y son capaces de movilizarse a través de la sangre pudiendo llegar a infectar la ubre a través de los capilares mamarios. Pero también puede producirse contaminación de la leche en el exterior de la mama debido a malas condiciones de producción y de conservación de la leche. En este caso los principales orígenes de contaminación son la piel de la mama, que aporta gérmenes resistentes a la desecación, el ambiente, que aporta gérmenes

esporulados y enterobacterias patógenas, el estado del ordeñador, que podría aportar gérmenes patógenos de origen humano, los utensilios y las máquinas empleadas en el proceso de ordeño, que aportan microorganismos del grupo *Escherichia-Enterobacter*, y la calidad del agua empleada en el lavado, que aporta la mayor parte de las bacterias gram-negativas psicrotrofas capaces de alterar la leche y sus derivados conservados a baja temperatura ((Alais, 1985b), <http://www.solidinternational.ch/wp-content/themes/solid/sources/img/1-Calidad-de-la-leche-Marco-referencial-final1.pdf>).

En la Unión Europea se establece un criterio de higiene basado en el recuento total de microorganismos mesófilos, que para especies distintas a la vaca oscila, según el destino que se le dé a la leche, entre 500000 ufc/ml, si no va a ser sometida a tratamiento térmico, y 1500000 ufc/ml, si ésta va a ser tratada térmicamente antes de su uso (Parlamento Europeo, 2004). Asimismo, la leche de cabra puede ser portadora de microorganismos peligrosos para la salud humana, como *Staphylococcus aureus* o *Listeria monocytogenes* (Deinhofer & Pernthaner, 1995), que se encuentran contemplados en la normativa vigente en la Unión Europea (Comisión Europea, 2005), y en los últimos años, a esta lista se han sumado otros microorganismos no tan frecuentes en estos productos como son *Escherichia coli* enteropatogénico (EPEC), *Escherichia coli* enterohemorrágico productor de toxinas Shiga (VTEC) o *Cronobacter sakazakii*. (Friedemann, 2007; Silanikove et al., 2010; Zweifel et al., 2010).

La importancia de la leche y los productos lácteos en brotes y casos de infecciones e intoxicaciones alimentarias declaradas en Francia y varios países tanto europeos como americanos ha sido revisada por De Buyser et al. (2001). En Francia, durante la década 1988 – 1997, el porcentaje de brotes asociados a estos alimentos fue del 4,6%, correspondiendo la mayoría a *S. aureus* (104 de 107 casos). En el resto de los países, durante otro periodo de tiempo (1980 – 1994), la leche y los productos lácteos involucrados oscilaban entre el 1 y el 5%.

Tanto en Francia como en el resto de los países evaluados, los brotes debidos a *S. aureus* se debieron a la presencia de enterotoxinas de esta bacteria en queso

---

elaborados con leche cruda o sometida a un tratamiento térmico, siendo significativo el papel de quesos fabricados con leche de oveja y cabra.

La incidencia de tipos patógenos de *E. coli* parece ser menor, aunque se han contabilizado varios brotes asociados a quesos elaborados con leche cruda y pasteurizada de pequeños rumiantes; entre ellos destacan los causados por cepas adscritas a *Escherichia coli* enterohemorrágico (EHEC) y, en menor medida, a otros grupos patógenos (De Buyser et al., 2001). No obstante la importancia de estos otros grupos no puede ser evaluada porque su identificación molecular rutinaria solo se ha llevado a cabo recientemente.

Todos estos datos deben de ser interpretados con cautela porque los servicios de información epidemiológicos tienen limitaciones y, además, la identificación de algunos de los agentes es difícil. No obstante, parece obvio que la leche de pequeños rumiantes presenta un riesgo asociado a la presencia de bacterias patógenas como *S. aureus* y ciertos patotipos de *E. coli*, especialmente en queso elaborado con leche cruda, aunque también en otros productos lácteos tales como cuajada, leche chocolateada e incluso yogurt.

La primera vez que se notificó un brote debido a *Cronobacter sakazakii* (anteriormente denominado *Enterobacter sakazakii*) fue en 1958, en Inglaterra, donde se detectaron dos casos de meningitis neonatal que concluyeron con el fallecimiento de los dos niños, y desde entonces se han producido varios casos en todo el mundo. Aunque la incidencia de la infección por *C. sakazakii* es baja, la infección por este microorganismo se asocia con tasas de morbilidad y mortalidad significativas (33 / 80 %), y esto, desde el punto de vista de que el principal rango de población que se ve afectado son los lactantes, supone un grave problema. A pesar de que la mayoría de los brotes se han asociado con el consumo de fórmulas infantiles en polvo, también se ha aislado *C. sakazakii* de leche en polvo, queso, alimentos infantiles, carne picada, salchichas y vegetales, por lo que las fuentes de *C. sakazakii* y sus vehículos de transmisión no están todavía claros (Drudy et al., 2006; Friedemann, 2007).

## Tipificación de los microorganismos.

La caracterización de los microorganismos patógenos es útil para determinar sus relaciones biológicas y genéticas, información de gran importancia para los clínicos, microbiólogos y epidemiólogos comprometidos con la investigación en esta área.

Hasta la aparición de las técnicas moleculares, el diagnóstico de una infección causada por microorganismos patógenos se realizaba mediante el aislamiento y caracterización de dicho microorganismo empleando técnicas fenotípicas convencionales (tinción de Gram, morfología tanto de las células como las colonias, propiedades bioquímicas y serológicas,...) con las limitaciones que ésto puede suponer, ya que las características metabólicas y morfológicas de las bacterias pueden cambiar en función de la expresión génica. Con la aparición de las técnicas de tipificación molecular se abrió un nuevo campo que permitió mejorar la identificación bacteriana basándose en la composición de las moléculas biológicas o los ácidos nucleicos, permitiendo diferenciar cambios muy sutiles entre los distintos clones que con otras técnicas pasarían inadvertidos. Además las técnicas genotípicas basadas tanto en ADN como en ARN suponen una valiosa herramienta para la confirmación taxonómica y la identificación de las especies, así como para realizar estudios epidemiológicos (Liu, 2011; Persing, 2004).

En la investigación de brotes epidémicos la tipificación permite determinar la expansión clonal de un patógeno en el ambiente e identificar la fuente primaria de infección. Además, supone una ayuda importante para los sistemas de vigilancia epidemiológica encargados de monitorizar la dispersión de un clon y la prevalencia de las distintas cepas entre la población susceptible, tanto como para llevar a cabo una evaluación periódica de las estrategias de prevención y control, como para la detección y monitorización de infecciones emergentes o reemergentes. También presenta una importancia justificada en el ámbito de la industria alimentaria ya que permite conocer los reservorios de algunos microorganismos.

---

## OBJETIVOS.

Como se ha venido explicando a lo largo de esta introducción, la leche de cabra es un producto de demanda creciente que puede ser portador de microorganismos patógenos para los humanos. El estudio de estos microorganismos reviste especial interés de cara al diseño de estrategias de mejora del manejo del rebaño, del ordeño y de la propia calidad de la leche que permitan minimizar el riesgo de contaminación con estos patógenos de importancia en salud pública puesto que afectan a un rango de población muy amplio y suponen un riesgo constante para determinados grupos de personas.

Existen diversos estudios que analizan la bacteriología general de las explotaciones lecheras y que han servido para mejorar el rendimiento de la producción animal, pero pocos son los que se han centrado en evaluar la incidencia de los microorganismos patógenos humanos presentes en la leche de tanque, especialmente si hablamos de explotaciones de caprino. Un profundo conocimiento de la distribución y de las características de estos microorganismos que se pudieran encontrar en la leche de cabra puede ayudarnos a controlarlos ya desde el primer momento, en la explotación e incluso en el ordeño, evitando su propagación y llegada a la cadena alimentaria, consiguiendo con ello minimizar los riesgos para la población.

Por lo expuesto anteriormente, el objetivo principal del trabajo desarrollado en la presente tesis doctoral es la evaluación del riesgo que supone la presencia de ciertos microorganismos patógenos humanos en leche de cabra destinada a la industria alimentaria. Con este propósito, se plantean los siguientes objetivos parciales:

- Evaluar la calidad microbiológica de leche de cabra, procedente de pequeñas explotaciones, destinada al consumo humano y a la fabricación de productos derivados, prestando especial interés a la incidencia de *C. sakazakii*, *S. aureus* y ciertos tipos patógenos de *E. coli* (STEC, EPEC), mediante una búsqueda sistemática de éstos microorganismos.

- Abordar la caracterización de los microorganismos patógenos aislados de las muestras de leche, tanto de sus perfiles fenotípicos como de sus propiedades moleculares.
- Evaluar el comportamiento de algunos de estos microorganismos patógenos frente a la modificación de ciertos parámetros físico – químicos y durante la fabricación de productos derivados de la leche de cabra como son el yogurt y la cuajada.

## BIBLIOGRAFÍA.

- Alais, C., 1985. Infección de la mama y sus consecuencias. En Ciencia de la leche. Principios de técnica lechera. Reverté S.A., Barcelona, España. pp. 405-432.
- Anónimo, Leche y productos lácteos.  
([http://www.oviespana.com/extras/servicio\\_de\\_informacion/monograficos/monografia\\_251110.pdf](http://www.oviespana.com/extras/servicio_de_informacion/monograficos/monografia_251110.pdf)).
- Chambers J., 2002. “The microbiology of raw milk”. En Robinson R.K. (3rd Ed.), “Dairy Microbiology Handbook”. Wiley Intersciencie, New York, EE.UU. 39 - 90.
- Comisión Europea, 2005. REGLAMENTO (CE) No 2073/2005 DE LA COMISIÓN de 15 de noviembre de 2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. (DO L 338 de 22.12.2005, p. 1).
- De Buyser, M., Dufour, B., Maire, M., Lafarge, V., 2001. “Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialized countries”. International Journal of Food Microbiology. 67, 1-17.
- Deinhofer, M., Pernthaner, A., 1995. “*Staphylococcus* spp. as mastitis-related pathogens in goat milk” . Veterinary Microbiology. 43, 161-166.
- Drudy, D., Mullane, N., Quinn, T., Wall, P., Fanning, S., 2006. “*Enterobacter sakazakii*: an emerging pathogen in powdered infant formula”. Clinical Infectious Diseases. 42, 996-1002.

- 
- EFSA Panel on Biohazard, 2005. "Opinion on the usefulness of somatic cell counts for safety of milk and milk derived products from goats". EFSA Journal. 305, 1-19.
- EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA), 2012. "Scientific Opinion on the suitability of goat milk protein as a source of protein in infant formulae and in follow-on formulae". EFSA Journal. 10 (3), 2603.
- Friedemann, M., 2007. "*Enterobacter sakazakii* in food and beverages (other than infant formula and milk powder)". International Journal of Food Microbiology. 116, 1-10.
- Goursaud J., 1991. Composición y propiedades físico-químicas. En Luquet F. M. (Ed.), Leche y productos lácteos. Vaca-Oveja-Cabra. Acribia S.A., Zaragoza, España. 3-92.
- Haenlein, G., 2004. "Goat milk in human nutrition". Small Ruminant Research. 51, 155-163.
- ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods), 1998. "Milk and dairy products". "Microorganisms in foods 6. Microbial Ecology of Food Commodities". Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York, EE. UU. 643 – 715.
- Liu, D., 2011. "Molecular Detection of Human Bacterial Pathogens". CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, Florida, EE.UU.
- MAGRAMA, 2013. Estudio del panel de consumo 2012. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente.
- MAGRAMA, 2012a. Anuario de Estadística 2012. Capítulo 14. Efectivos y producciones ganaderas. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente.
- MAGRAMA, 2012b. Caracterización del sector ovino y caprino en España. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente.
- MURCIGRAN, MAGRAMA, 2012. Programa de mejora de la raza Murciano-Granadina. MURCIGRAN y MAGRAMA

Parlamento Europeo, 2004. REGLAMENTO (CE) No 853/2004 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 29 de abril de 2004 por el que se establecen normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal. (DO L 139 de 30.4.2004, p. 55).

Persing, D. H., 2004. "Molecular Microbiology. Diagnostic Principles and Practice". ASM Press, Washington, EE.UU.

Raynal-Ljutovac, K., Lagriffoul, G., Paccard, P., Guillet, I., Chilliard, Y., 2008. "Composition of goat and sheep milk products: An update". Small Ruminant Research. 79, 57-72.

Sanz-Ceballos, L., Ramos Morales, E., de la Torre Adarve, Gloria, Díaz Castro, J., Pérez Martínez, L., Sanz Sampelayo, M.R., 2009. "Composition of goat and cow milk produced under similar conditions and analyzed by identical methodology". Journal of Food Composition and Analysis. 22, 322-329.

Silanikove, N., Leitner, G., Merin, U., Prosser, C., 2010. "Recent advances in exploiting goat's milk: quality, safety and production aspects". Small Ruminant Research. 89, 110-124.

Zweifel, C., Giezendanner, N., Corti, S., Krause, G., Beutin, L., Danuser, J., Stephan, R., 2010. "Characteristics of Shiga toxin producing *Escherichia coli* isolated from Swiss raw milk cheese within a 3-year monitoring program". Journal of Food Protection. 73, 88-91.





**CAPÍTULO I. CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE LA  
LECHE DE CABRA, CON ATENCIÓN A LA PRESENCIA  
DE MICROORGANISMOS PATÓGENOS.**



## INTRODUCCIÓN.

### **Implicación de la leche y sus derivados en enfermedades de transmisión alimentaria.**

Pese a las mejoras higiénicas y tecnológicas introducidas, en la actualidad los productos lácteos siguen siendo causa de brotes de toxiinfecciones alimentarias (TIA), aunque en una proporción muy baja en comparación con otros alimentos. En España, según datos obtenidos del Sistema de Información Microbiológica, el 9,6 % de los brotes de enfermedades transmitidas por alimentos se han relacionado con leche o derivados lácteos (SIM, 2014). Por otra parte, los datos del último informe sobre zoonosis y enfermedades de transmisión alimentaria de la Unión Europea, muestran que los productos lácteos, principalmente el queso, se han visto implicados en el 5,4 % de los brotes de TIA durante el año 2012 (EFSA, 2014).

En la leche y sus derivados, como en la mayoría de los alimentos, uno de los peligros para el ser humano más frecuentes son los agentes biológicos, principalmente bacterias, aunque también se pueden encontrar mohos, virus o parásitos. Se considera que la aplicación de tratamientos térmicos, como la pasteurización, es una forma eficaz de control de estos peligros cuando provienen de la leche empleada como materia prima. No obstante, unas malas prácticas de fabricación, principalmente en productos cuyo proceso de elaboración incluye etapas de manipulación o de procesado posteriores al tratamiento térmico (por ejemplo el queso o la leche en polvo), pueden facilitar una contaminación cruzada o la incorporación de patógenos de origen ambiental. Además se debe considerar que algunas variedades de queso se elaboran a partir de leche cruda para mantener unas características organolépticas determinadas que los hacen muy apreciados, y esta práctica incrementa el riesgo. Tampoco podemos obviar que aún hoy, debido a algunas creencias o costumbres, algunas personas consumen la leche directamente tras el ordeño (Oliver et al., 2005).

El análisis de los datos epidemiológicos de Estados Unidos y varios países de la Unión Europea pone de manifiesto que *Salmonella* spp. y *Staphylococcus aureus* son

---

los principales agentes patógenos implicados en los brotes de TIA. En España, en el periodo desde 1994 hasta 2003 el número de brotes ocasionados por estos microorganismos fue de 2459 y 301 respectivamente (SIM, 2003). Analizando los datos de algunos países de la Unión Europea, los brotes de *S. aureus* relacionados con el consumo de queso supusieron el 20 % del total de brotes causados por este microorganismo. Otros agentes patógenos presentan una incidencia mucho menor, destacando *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli* (enterotoxigénicas y enterohemorrágicas, principalmente del serogrupo O157). Llama la atención que de *L. monocytogenes* en España se detectaron 11 casos relacionados con el consumo de queso durante el 2012, de los cuales 3 requirieron hospitalización y uno acabó con la muerte del paciente. Y aunque en España no se detectó ningún caso de *E. coli* patógeno durante el 2012, a nivel europeo se detectaron 12 brotes causados por *E. coli*, principalmente del serogrupo O157, alguno de ellos relacionado con el consumo de leche cruda. A pesar de esta menor incidencia, estos agentes presentaron una tasa de mortalidad considerablemente más alta (de 0,36 % para *E. coli* enterohemorrágica y de 17,8 % para *L. monocytogenes*) en comparación con el 0,14 % en los brotes causados por *Salmonella* spp., lo que hace de ellos patógenos emergentes de gran relevancia (EFSA, 2014).

A nivel mundial, también se han descrito casos de TIA causados por otros agentes patógenos como *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* o *Brucella melitensis* relacionados con el consumo de productos lácteos contaminados (Oliver et al., 2009). La gama de productos lácteos implicados en los brotes de TIA descritos es muy diversa, siendo difícil establecer un patrón concreto, pero el consumo de leche no pasteurizada, y también de leche pasteurizada, incluso UHT, se ha involucrado en la mayoría de brotes (7,3 %), seguido de los quesos de diferentes variedades (2,3 %). Ocasionalmente también se han visto implicados otros productos lácteos, como nata, mantequilla y yogurt. Tampoco se puede olvidar la leche en polvo maternizada, que se ha relacionado con algunos casos de enfermedad grave por *Cronobacter sakazakii* en recién nacidos, principalmente prematuros (Drudy et al., 2006; Iversen & Forsythe, 2003). En la mayoría de los casos en que la leche había sufrido un tratamiento térmico, la presencia de los microorganismos responsables se

asoció a contaminaciones posteriores por malas prácticas higiénicas durante el proceso de elaboración.

## **Características de los microorganismos seleccionados para este trabajo.**

Del conjunto de bacterias patógenas de posible transmisión por la leche o sus derivados, este trabajo se centra en tres de ellos, *Staphylococcus aureus*, como uno de los principales agentes patógenos implicados en los brotes de TIA, *Escherichia coli*, tanto verotoxigénico como enteropatógeno, y *Cronobacter sakazakii*, como patógeno emergente que se ha relacionado con problemas de salud serios, sobre todo en niños lactantes, y que a pesar de conocerse poco sobre su ecología, un número creciente de informes apuntan a los preparados en polvo para lactantes, lo que nos lleva a pensar que también podría encontrarse en la leche (WHO., 2007).

A continuación se revisan los aspectos más relevantes de la biología de *C. sakazakii*, mientras que una descripción en profundidad sobre la biología de *S. aureus* y de *E. coli* se hará en los siguientes capítulos.

### **Biología de *C. sakazakii*.**

*Cronobacter sakazakii* es un bacilo que mide 0,3 a 1 por 1 a 6  $\mu\text{m}$ . Aunque inicialmente se referían a este microorganismo como “*Enterobacter cloacae* de color amarillo”, en 1980 fue descrito como una nueva especie, *Enterobacter sakazakii*. Sin embargo, actualmente hay suficientes datos que nos indican que constituye un nuevo género, denominado *Cronobacter*, dentro de la familia Enterobacteriaceae. Es un Gram-negativo, anaerobio facultativo, no esporulado y móvil gracias a la presencia de flagelos peritricos. (Lehner et al., 2011; Pagotto & Abdesselam, 2007)

Es un patógeno oportunista emergente que se encuentra ampliamente distribuido en el ambiente pero solo afecta a un pequeño sector de la población, principalmente a niños menores de 1 año. Se ha relacionado con infecciones infantiles como bacteremia, enterocolitis necrotizante (NEC) y meningitis, y presenta una tasa de

---

mortalidad infantil del 50-80 %. Rara vez se han dado casos en adultos, y en los que han ocurrido, produce infección, bacteremia y neumonía, siendo la mayoría de los pacientes inmunocomprometidos o de edades avanzadas. La infección en neonatos se ha ligado, en términos epidemiológicos, con la ingesta de fórmulas infantiles contaminadas, ya que se ha visto que *C. sakazakii* es capaz de sobrevivir en los componentes que se añaden en dichas fórmulas debido a su capacidad de tolerancia al estrés osmótico y a las altas temperaturas. La dosis necesaria para que ocurra la infección es muy baja, inferior a 10 ufc/100 g de fórmula infantil (Farber & Forsythe, 2008; Friedemann, 2007; Healy et al., 2010; Lehner et al., 2011).

El mecanismo de patogenicidad de este microorganismo todavía no ha sido definido, pero en el caso de la meningitis neonatal se especula que una posible ruta de infección sea la translocación de la bacteria desde la sangre hasta el líquido cefalorraquídeo, y posteriormente se produzca una infección de la matriz cerebral gracias a la acción de la proteína de membrana externa OmpA que se ha observado que facilita la invasión de las células endoteliales del cerebro (Healy et al., 2010). Además se sabe que la capacidad de producir una cápsula y la formación de biofilm, contribuyen a la supervivencia y aumentan la resistencia de este microorganismo a la mayoría de los tratamientos antimicrobianos (Friedemann, 2007).

Debido a que afecta a la parte más joven y vulnerable de la población es importante aumentar la atención y la vigilancia para controlar este microorganismo que puede ocasionar graves infecciones neonatales (Farber & Forsythe, 2008). En España se aplica el Reglamento de la Comisión Europea 2073/2005 (Comisión Europea, 2005) relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimentarios, y en él se contempla el análisis de este microorganismo en preparados deshidratados para lactantes y alimentos dietéticos deshidratados destinados a usos médicos especiales para lactantes de menos de seis meses. Debido a la gravedad de la infección y dado que la leche de cabra se emplea como sustituta de otras leches en alimentación infantil, es interesante estudiar la incidencia de *C. sakazakii* en la misma. Se están desarrollando numerosas estrategias de prevención que pretenden limitar el crecimiento de *C. sakazakii*, y que van desde el uso de bacteriófagos hasta el uso de probióticos, pasando por la leche humana y el uso de compuestos orgánicos naturales

con actividad antimicrobiana (Healy et al., 2010). Sin embargo, a pesar de que es bien conocido que *C. sakazakii* se podría aislar de alimentos tanto crudos como procesados, como de alguno de los ingredientes que se emplean para elaborarlos, la presencia de *C. sakazakii* en otros alimentos distintos a las fórmulas infantiles ha sido poco investigada hasta el momento (Friedemann, 2007).

Por lo tanto con este trabajo se pretendía realizar una búsqueda sistemática de algunos microorganismos patógenos como son *C. sakazakii*, *S. aureus* y *E. coli* con el fin de determinar su incidencia en la leche de cabra destinada al consumo humano como posible vehículo transmisor de enfermedades.

## MATERIAL Y MÉTODOS.

### 1.- Toma de muestras.

Durante 18 meses (septiembre 2010 - marzo 2012) se tomaron muestras de leche de tanque, agua, aire, pienso y heces en suelo de 68 explotaciones de ganado caprino de las provincias de León y Zamora englobadas en dos cooperativas, Consorcio de Promoción del Ganado Ovino (CPO) y Nutecal.

Los rebaños seleccionados se componían de cabras de las razas murciano-granadina y alpina y empleaban un sistema de producción semi-intensivo, con ordeño mecánico y una tasa reproductiva próxima a un parto al año.

El muestreo se realizó como se describe a continuación:

- **Leche de tanque:** se tomaron 100 ml de leche de cabra de tanque en 2 recipientes estériles de 50 ml (VWR, Radnor, Pensilvania, EE.UU.).
- **Aire:** utilizando el muestreador *Air Sampler RCS Plus* (Biotest Hycon, Dreieich, Alemania) y tiras del medio *Tryptone Soya Agar* (TSA, Oxoid, Hampshire, Reino Unido) se tomaron veinte litros de aire en los establos de las explotaciones, incluyendo también la zona de ordeño.

- 
- **Agua:** se tomaron 250 ml de muestra del agua de bebida de los animales en recipientes de vidrio estériles.
  - **Pienso:** se tomaron muestras del alimento de los animales en bolsas de plástico estériles.
  - **Heces en suelo:** se tomaron muestras de las heces de los animales mediante el uso de calzas estériles de recogida de muestras Sterisox (Sodibox Pont C'hoat, Nevez, Francia) como se describe en el protocolo de control de *Salmonella* en aves de corral de la Comisión Europea (Comisión Europea, 2011). Se utilizó un par de calcetines por explotación dándose al menos 100 pasos para cubrir los distintos sectores de la granja, poniendo especial énfasis en la zona de descanso, dado que es dónde se acumulan mayor cantidad de deposiciones. Las calzas fueron humedecidas previamente con una solución estéril compuesta por 0,8 % de cloruro sódico (Panreac Química, S.L.U, Barcelona, España) y 0,1 % de agua de peptona (Oxoid). Una vez terminado el muestreo, con cuidado de no desprender el material adherido, los calcetines se depositaron en bolsas estériles.



Figura I.1. Tipos de muestras recogidas en las distintas explotaciones. De izquierda a derecha: aire (muestreador), leche, pienso, agua y heces en suelo.

Todas las muestras recogidas se transportaron en refrigeración para evitar la rotura de la cadena de frío y la proliferación indeseada de las bacterias.

Además, durante los meses de Marzo a Mayo del año 2011 se recibieron 426 muestras procedentes de pacientes del hospital de León que presentaban diarrea. Las muestras recibidas llegaron en tres formatos diferentes:

- Placas de *Cefixime Tellurite Sorbitol MacConkey Agar* (CT-SMAC, BioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia) con cepa de *E. coli* aislada.
- Placas de Columbia Agar con 5 % de sangre ovina (Becton Dickinson, Sparks, MD, EE.UU.) con siembra directa de heces.
- Placas de CT-SMAC con siembra directa de heces.

Se conservaron a refrigeración hasta el momento de su procesado.

## **2.- Procesado de las muestras de leche.**

### **2.1.- Recuento de microorganismos mesófilos viables.**

Partiendo de 1 ml de leche de tanque se realizaron 5 diluciones seriadas 1:10 en agua de peptona al 0,9 % que se sembraron, por duplicado, en superficie (100 µl de cada dilución) de placas de *Plate Count Agar* (PCA, Oxoid) y se incubaron durante 72 horas a 30 °C.

### **2.2.- Aislamiento de *Cronobacter sakazakii* (*C. sakazakii*).**

Se llevó a cabo siguiendo el protocolo establecido por la ISO/TS 22964 como se muestra en la figura I.2.

#### **2.2.1.- Enriquecimiento no selectivo.**

De cada muestra de leche de tanque se realizó una dilución 1:10 en *Buffered Peptone Water* (BPW, Oxoid) tomando 1 ml de leche y 9 ml del medio. La dilución se incubó a 37 °C durante 18 horas.

### 2.2.2.- Enriquecimiento selectivo y aislamiento.

Se realizaron dos tipos de enriquecimiento selectivo, uno en *Modified Lauryl Sulphate Tryptose Broth Base* suplementado con vancomicina (mLST/V, Oxoid), y el otro empleando *Cronobacter Screening Broth* también suplementado con vancomicina (CSB/V, Oxoid). Para ello se transfirió 0,1 ml del enriquecimiento no selectivo a tubos que contenían 10 ml de cada uno de los medios de enriquecimiento selectivo. Ambos caldos se incubaron a 42 °C durante 24 horas.

Alícuotas de 100 µl de cada uno de los dos caldos de enriquecimiento selectivo se sembraron en la superficie de dos tipos de medio de aislamiento distinto, *Enterobacter sakazakii Isolation Agar* (ESIA, Oxoid) y *Chromogenic Cronobacter Isolation Agar* (CCI, Oxoid), incubándose a 44 °C durante 24 horas.

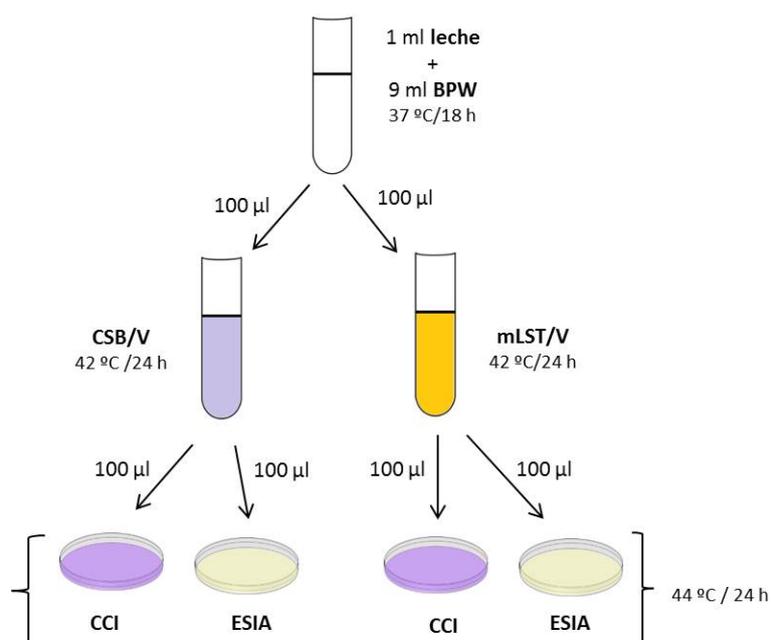


Figura I.2. Esquema de aislamiento de *Cronobacter sakazakii*.

### 2.2.3.- PCR de los enriquecimientos.

Se realizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de los enriquecimientos, tanto del no selectivo (BPW) como de los dos selectivos (mLST/V y CSB/V), tras su incubación, para detectar las posibles cepas de *C. sakazakii* presentes

mediante la detección del gen *ompA*, que codifica para una proteína de la membrana externa. Este gen presenta alta homología con el de otras especies de la familia *Enterobacteriaceae*, pero se puede diferenciar empleando cebadores diseñados para amplificar un fragmento de 469 pb específico de *C. sakazakii* (Mohan Nair & Venkitanarayanan, 2006). Como control positivo se empleó la cepa de *Cronobacter sakazakii* (CECT 858) suministrada por la Colección Española de Cultivo Tipo.

Se extrajo el ácido desoxirribonucleico (ADN) de los 3 tipos de enriquecimiento llevados a cabo, el enriquecimiento no selectivo en BPW, y los dos enriquecimientos selectivos, mLST/V y CSB/V. Para ello se transfirió 1 ml del enriquecimiento correspondiente a un tubo estéril. Se centrifugó durante 3 minutos a 15700 g en una microcentrífuga Eppendorf 5415 D (Eppendorf, Hamburgo, Alemania), se descartó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 1 ml de *Phosphate Buffered Saline* (PBS, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EE.UU.). Se centrifugó nuevamente durante 3 minutos a 15700 g, y se resuspendió el precipitado en una mezcla de lisis que contenía 450 µl de agua Milli-Q estéril, 50 µl de Tritón X-100 al 1 % (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania) y resina Chelex 100 al 2 % (Bio-Rad, Hercules, California, EE.UU.), se incubó durante 15 min a 100 °C para romper las células y liberar el ADN. Se centrifugó durante 3 minutos a 15700 g y se guardó a congelación (-20 °C) hasta el momento de su uso.

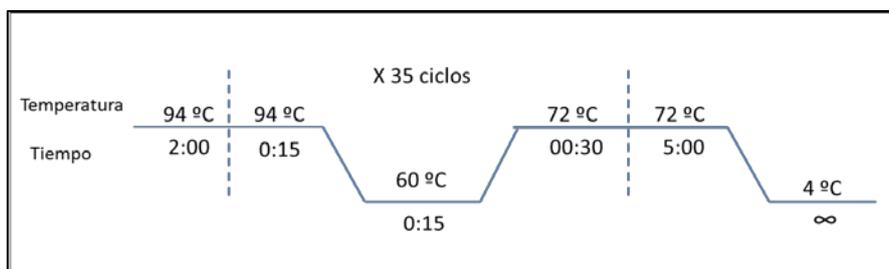
Para llevar a cabo la PCR se emplearon los pares de cebadores descritos en la tabla I.1.

Tabla I.1. Cebadores empleados en la amplificación del gen *ompA* de *C. sakazakii*.

| Diana       | Cebador | Secuencia (5'→3')     | Tamaño (pb) | Referencia                            |
|-------------|---------|-----------------------|-------------|---------------------------------------|
| <i>ompA</i> | ESSF    | GGATTTAACCGTGAACCTTTC | 469         | (Mohan Nair & Venkitanarayanan, 2006) |
|             | ESSR    | CGCCAGCGATGTTAGAAGA   |             |                                       |

Para detectar el gen *ompA* se empleó una PCR, en la cual la reacción, con un volumen total de 50 µl, estaba compuesta por 1 µl de cada cebador (ESSF y ESSR) preparado a una concentración de 25 µM, 20 µl de Master mix (2,5X, 5-PRIME, Hamburgo, Alemania), 5 µl de ADN muestra y 23 µl de agua Milli-Q estéril. La

amplificación se realizó en un termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf) bajo las siguientes condiciones, descritas por Mohan Nair y Venkitanarayanan (2006):



El resultado se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa (US Biological, Swamscott, MA, EE.UU.) preparado al 1,5 % en TAE 0,5X (Scharlau, Barcelona, España), empleando como tinción para los ácidos nucleicos RedSafe (iNtRON Biotechnology, INC., Sungnam, Kyungki-Do, Korea) y el transiluminador de luz UV, Mini-Transilluminator (Bio-Rad). Se fotografió empleando el sistema de documentación de geles Digimage System acoplado a una cámara digital Canon Power Shot G11 (Major Science, Taipei, Taiwan).

## 2.3.- Aislamiento de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*).

### 2.3.1.- Aislamiento selectivo.

De cada muestra de tanque de leche se realizó una siembra directa de 100 µl de la leche, y otra de 100 µl de una dilución 1:10 en agua de peptona al 0,9 %, en ambos casos mediante siembra en superficie en placas de *Baird-Parker Agar Base* (Oxoid) suplementado con plasma de conejo y fibrinógeno (Biokar Diagnostics, Allones, Francia) (BP-RPF). Se incubaron durante 24 horas a 37 °C. El BP-RPF es un medio selectivo y diferencial para el aislamiento y recuento de estafilococos coagulasa positivos. Los estafilococos producen colonias de color de gris oscuro a negro debido a la reducción del telurito, y aquellos que son coagulasa positivos presentan un halo blanquecino alrededor de las colonias.

### **2.3.2.- Recuento.**

Una vez identificadas las colonias de *S. aureus* coagulasa positivas se realizó un recuento, y posteriormente algunas (hasta un máximo de 10) se transfirieron a nuevas placas de BP-RPF para su confirmación, y a su vez también a placas de *Mannitol Salt Agar* (MSA, Oxoid) que se incubaron 24 horas a 37 °C. El MSA es un medio selectivo y diferencial que permite el crecimiento de estafilococos capaces de crecer en concentraciones superiores al 7,5 % de Cloruro sódico (NaCl), y diferencia estafilococos capaces de fermentar el manitol.

### **2.3.3.- Conservación de las cepas.**

Las presuntas cepas de *S. aureus* se inocularon en caldo *Brain Heart Infusion* (BHI, Oxoid) que se incubó a 37 °C durante 18 horas. Posteriormente se transfirió 1 ml del caldo a un tubo estéril de 1,5 ml y se centrifugó durante 3 minutos a 15700 *g* en una microcentrífuga Eppendorf 5415 D (Eppendorf). Se descartó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 1 ml de agua Milli-Q estéril, se centrifugó nuevamente durante 3 minutos a 15700 *g* y el precipitado se resuspendió en 1 ml de *Nutrient Broth* (NB, Oxoid) con 0,6 % de extracto de levadura y 30 % de glicerol. Las cepas aisladas se conservaron a -20 °C.

## **2.4.- Aislamiento de tipos patógenos de *Escherichia coli* (*E. coli*).**

### **2.4.1.- Enriquecimiento no selectivo de las muestras.**

Se realizó un enriquecimiento no selectivo con todas las muestras de leche de tanque tomadas. Para ello se utilizó una solución de *Tryptone Soya Broth* (TSB, Oxoid) con extracto de levadura al 0,6 %. El procedimiento llevado a cabo con las muestras de leche de tanque consistió en mezclar en botellas de vidrio (1 litro) estériles 50 ml de leche con 450 ml del caldo de enriquecimiento y se incubó la mezcla a 42 °C en una estufa Heraeus T5042E (Heraeus Materials Technology GmbH & Co. KG, Hanau, Alemania) durante 18 horas (Baylis, 2008; Vimont et al., 2006).

## 2.4.2.- PCR de los enriquecimientos no selectivos.

Se realizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de los enriquecimientos no selectivos tras su incubación para detectar las posibles cepas de *E. coli* patógenas mediante la detección del gen que codifica la Intimina (*eae*) y de los genes que codifican las verotoxinas (*stx1* y *stx2*).

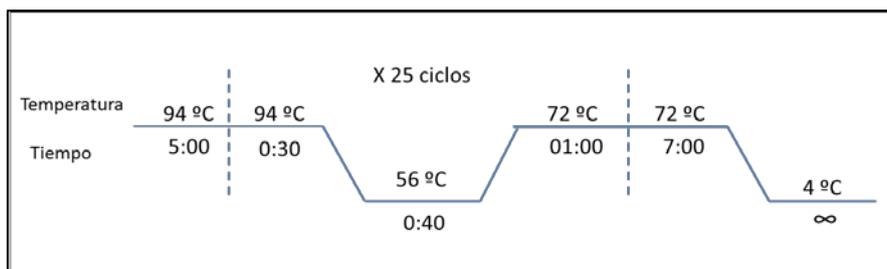
El ADN de estas cepas se obtuvo con el mismo protocolo descrito en el apartado 2.2.3 del presente capítulo para obtener el ADN de *C. sakazakii*. Como control positivo se empleó la cepa de *E. coli* O157:H7 (CECT 4076) suministrada por la Colección Española de Cultivos Tipo.

Para llevar a cabo la PCR se emplearon los pares de cebadores descritos en la tabla I.2.

Tabla I.2. Cebadores empleados en la amplificación de los genes *stx1*, *stx2* y *eae* de *E. coli*.

| Diana       | Cebador | Secuencia (5'→3')         | Tamaño (pb) | Referencia             |
|-------------|---------|---------------------------|-------------|------------------------|
| <i>stx1</i> | VT1a    | GAAGAGTCCGTGGGATTACG      | 130         | (Pollard et al., 1990) |
|             | VT1b    | AGCGATGCAGCTATTAATAA      |             |                        |
| <i>stx2</i> | SLTII1  | CTTCGGTATCCTATTCCCGG      | 448         | (Olsen, 1995)          |
|             | SLTII2  | GGATGCATCTCTGGTCATTG      |             |                        |
| <i>eae</i>  | SK1     | CCCGAATTCGGCACAAGCATAAGC  | 881         | (Oswald et al., 2000)  |
|             | SK2     | CCCGGATCCGTCTCGCCAGTATTCG |             |                        |

Para detectar el gen *eae* se empleó una PCR en la cual la reacción, con un volumen total de 50 µl, estaba compuesta por 1 µl de cada cebador (SK1 y SK2) preparado a una concentración de 25 µM, 20 µl de Master mix (2,5X, 5-PRIME, Hamburgo, Alemania), 5 µl de ADN muestra y 23 µl de agua Milli-Q estéril. Para detectar los genes *stx1* y *stx2* se empleó una PCR múltiple, en la cual la reacción de PCR era similar, pero añadiendo 0,5 µl de cada cebador (VT-1a, VT-1B, SLTII-1 y SLTII-2) preparado a una concentración de 25 µM. La amplificación de los tres genes se realizó en un termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf) bajo las siguientes condiciones:



El resultado se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa como se ha descrito anteriormente en el apartado 2.2.3.

### 2.4.3.- Aislamiento selectivo y conservación de las cepas.

A partir de los enriquecimientos no selectivos se realizó una siembra por agotamiento en placas de SMAC (Oxoid) que se incubaron a 37 °C durante 18 horas, para posteriormente aislar hasta 10 colonias fermentadoras de sorbitol y 10 colonias no fermentadoras de sorbitol. Las colonias se sembraron nuevamente en *MacConkey Agar* y en SMAC (Oxoid) para detectar a su vez la fermentación, o no, de la lactosa tras ser incubadas a 37 °C durante 18 horas. Una vez aisladas las distintas colonias, se extrajo el ADN y se realizó la PCR para identificar las cepas que contienen los genes de patogenicidad *eae*, *stx1* y *stx2*, de la forma ya descrita en el apartado 2.4.2. Las colonias que poseían alguno de estos genes se sembraron nuevamente en *Agar Triptona Soja*, (TSA, Oxoid), se incubaron a 37 °C durante 18 horas. Transcurrido el tiempo de incubación, con ayuda de un asa de siembra se recogió una pequeña cantidad de colonia que se transfirió a un tubo estéril de 1,5 ml con 1 ml de agua Milli-Q estéril, se centrifugó durante 3 minutos a 15700 *g* en una microcentrífuga (Eppendorf 5415 D), y tras descartar el sobrenadante se resuspendió el precipitado en 1 ml de NB (Oxoid) con 0,6 % de extracto de levadura y 30 % de glicerol. Posteriormente se congelaron a -20 °C para su conservación.

---

### 3.- Procesado de muestras ambientales.

#### 3.1.- Aislamiento de *Escherichia coli* (*E. coli*).

##### 3.1.1.- Enriquecimiento no selectivo de las muestras.

Al igual que en el caso de las muestras de leche de tanque se realizó un enriquecimiento no selectivo con todas las muestras tomadas. Para ello se utilizó una solución de *Tryptone Soya Broth* (TSB, Oxoid) con *Yeast Extract* (YE, Oxoid) al 0,6 % (Baylis, 2008; Vimont et al., 2006).

El procesado de los distintos tipos de muestra ambiental fue el siguiente:

- **Aire:** Las muestras fueron tomadas en tiras HYCON (Biotest Hycon, Dreieich, Alemania) con el medio general *Tryptone Soya Agar* (TSA, Oxoid). Se mezcló cada una de las tiras de TSA con 50 ml de la solución de enriquecimiento, se homogeneizó y posteriormente se incubó.
- **Agua:** Se filtraron los 250 ml del agua de bebida de cada una de las granjas mediante una bomba de vacío empleando filtros de celulosa de 0,45 µm de poro (Pall Corporation, Michigan, EE.UU.). El filtro se mezcló con 50 ml de la solución de enriquecimiento, se homogeneizó y se incubó.
- **Pienso:** Se pesaron 25 g de pienso y se mezclaron con 225 ml de solución de enriquecimiento, se homogeneizó la mezcla y se incubó.
- **Heces en suelo:** Se mezclaron las calzas con 225 ml de solución de enriquecimiento, se homogeneizó y se incubó.

Todos los homogeneizados se realizaron durante un minuto y medio con el homogeneizador BagMixer 400 P (Interscience, Saint Nom, Francia) y se incubaron a 42 °C en una estufa Heraeus T5042E durante 18 horas.

Una vez obtenidos los enriquecimientos no selectivos se procedió a procesar las muestras del mismo modo que en el caso de las muestras de tanque de leche, tanto para el análisis genético, como para el aislamiento selectivo y su posterior conservación.

## **4.- Procesado de muestras clínicas.**

### **4.1.- Aislamiento de *Escherichia coli* (*E. coli*).**

Partiendo de las cepas que se recibieron aisladas en placas de CT-SMAC se sembró una colonia en medio TSA incubando las placas a 37 °C durante unas 24 horas. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se tomó cantidad suficiente de crecimiento y se guardó en NB (Oxoid) que contiene 0,6 % de extracto de levadura y un 30 % de glicerol. Se congelaron a -20 °C para su conservación y posterior caracterización.

#### **4.1.1.- Enriquecimiento no selectivo de las muestras.**

En el caso de las placas que se recibieron en *Columbia Agar* y CT-SMAC con siembra directa de heces se tomó con un asa de siembra una parte representativa del crecimiento de cada una de las placas realizando un enriquecimiento en TSB (Oxoid) con extracto de levadura al 0,6 % y se incubó a 37 °C durante 24 horas. Una vez transcurrido este tiempo se procedió a sembrar los enriquecimientos en el medio selectivo y diferencial CT-SMAC (Oxoid) para posteriormente buscar, tanto en los enriquecimientos como en las colonias aisladas, mediante PCR, los genes que codifican para las toxinas Shiga (*stx1* y *stx2*) y el gen *eae* utilizando las condiciones descritas anteriormente (apartado 2.4.2.). Los aislados positivos a alguno de los genes se guardaron, como en el caso anterior, en NB (Oxoid) con 0,6 % de extracto de levadura con un 30 % de glicerol para caracterizarlos posteriormente. Se congelaron a -20 °C para su conservación.

---

## RESULTADOS.

En total, se tomaron 242 muestras en explotaciones caprinas, que correspondían a 68 de leche de tanque y puntos de descarga, 45 de aire, 42 de agua, 43 de pienso y 44 de heces en suelo. Las muestras ambientales no se pudieron tomar en todas las explotaciones por las características de las mismas.

### 1.- Recuento de microorganismos mesófilos viales.

La media del número de microorganismos mesófilos viables presentes en las 68 muestras de leche de cabra procedentes de distintas explotaciones y puntos de descarga determinada mediante recuento en placa fue de 4,8 log ufc/ml mientras que el valor de la mediana fue 4,7 log ufc/ml, con un mínimo de 3,1 log ufc/ml y un máximo de 6,4 log ufc/ml. Estos valores estadísticos se muestran en la tabla I.3. La distribución de las frecuencias del recuento en placas estándar se muestra en la figura I.3.

Tabla I.3. Selección de valores estadísticos del recuento en placas estándar de microorganismos mesófilos detectados en muestras de leche de tanque de explotaciones caprinas y puntos de descarga.

|                              | Recuento en placas estándar (log ufc/ml) |
|------------------------------|--|
| <b>Mediana</b>               | 4,7                                      |
| <b>Moda</b>                  | 4,0                                      |
| <b>Media aritmética (MA)</b> | 4,8                                      |
| <b>Media geométrica (MG)</b> | 4,7                                      |
| <b>Desviación estándar</b>   | 1,1                                      |
| <b>Mínimo</b>                | 3,1                                      |
| <b>Máximo</b>                | 6,4                                      |

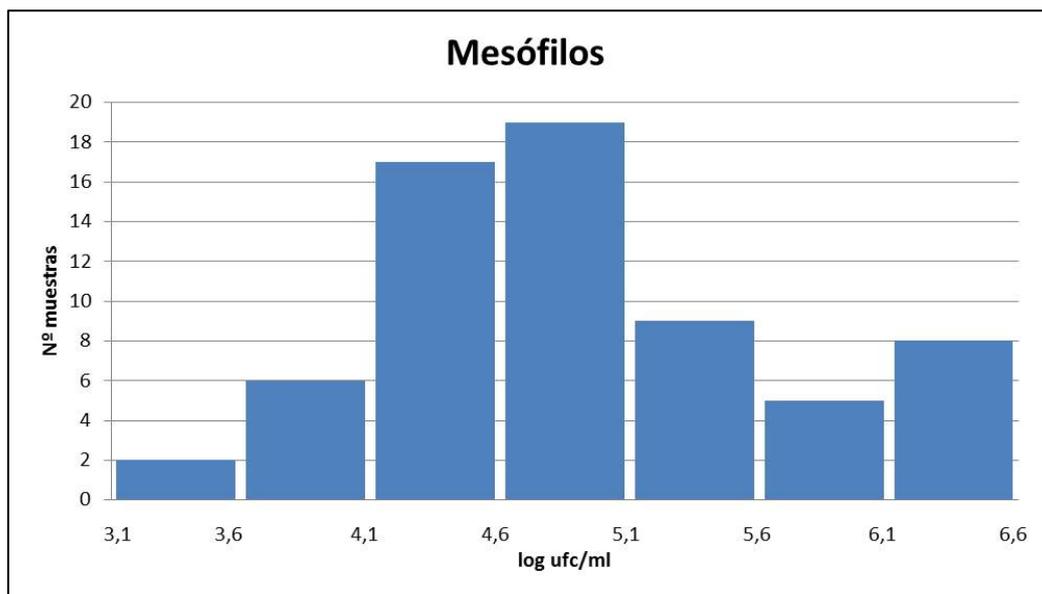


Figura I.3. Frecuencia de distribución del recuento en placa de microorganismos mesófilos detectados en muestras de leche de tanque de explotaciones caprinas y puntos de descarga. En el eje de abscisas se representan los intervalos.

Como se muestra en la tabla I.4, la mayoría de nuestras muestras (84 %) se encuentran por debajo de 500000 ufc/ml y el 91 % por debajo de 1500000 ufc/ml, que son los límites establecidos en el R.(CE) 853/2004 (Parlamento Europeo, 2004) para la elaboración de derivados lácteos a partir de leche cruda (500000 ufc/ml) o cuando la leche cruda se destina a la elaboración de leche de consumo tratada térmicamente o a la fabricación de productos lácteos a base de leche tratada térmicamente (1500000 ufc/ml).

Tabla I.4. Distribución en función de los límites legales establecidos en el Reglamento (CE) 853/2004 (Parlamento Europeo, 2004) de los recuentos de microorganismos mesófilos obtenidos en las distintas explotaciones. Media aritmética (MA) y media geométrica (MG) de los valores obtenidos en los recuentos.

| ufc/ml           | MA      | MG      | Nº muestras | %     |
|------------------|---------|---------|-------------|-------|
| <500000          | 66000   | 31000   | 57          | 83,82 |
| 500000 – 1500000 | 840000  | 820000  | 5           | 7,35  |
| > 1500000        | 2000000 | 2000000 | 6           | 8,82  |
|                  |         |         | 68          |       |

---

## **2.- Incidencia de *Cronobacter sakazakii*.**

En las 68 muestras de leche de cabra se investigó la presencia de *C. sakazakii* obteniéndose un resultado negativo para la PCR de los dos tipos de enriquecimiento llevados a cabo. Mediante aislamiento en los correspondientes medios selectivos específicos para este microorganismo se obtuvieron algunas colonias que fenotípicamente podrían confundirse con nuestro microorganismo de interés, pero tras realizar la comprobación mediante PCR se confirmó que no se correspondían con *C. sakazakii* ya que no poseían el gen característico (*ompA*) que nos permite identificarlos a nivel molecular.

## **3.- Recuento y aislamiento de *Staphylococcus aureus*.**

En 45 (66 %) de las 68 muestras de leche se detectaron colonias con características compatibles con *S. aureus* en las placas de BP-RPF. El resultado del recuento obtenido se muestra en la tabla I.5. El valor de la mediana de las muestras de leche de cabra en las que se pudo realizar el recuento de *S. aureus* fue de 2,48 log ufc/ml, con un valor máximo de 3,40 log ufc/ml, aunque en dos muestras no se pudo realizar el recuento por aparecer contaminación en césped y se estimó en un valor superior a 4,7 log ufc/ml. En las 23 explotaciones restantes (44 %) *S. aureus* se encontró por debajo del límite de detección (< 1 log ufc/ml).

Tabla I.5. Recuento de *S. aureus* presentes en muestras de leche de tanque procedente de explotaciones caprinas.

| Nº de muestra | Recuento log ufc/ml | Nº de muestra | Recuento log ufc/ml |
|---------------|---------------------|---------------|---------------------|
| 3             | 3,40                | 43            | 3,00                |
| 8             | 2,30                | 44            | 2,60                |
| 11            | 3,38                | 45            | 1,85                |
| 12            | 2,34                | 46            | 2,11                |
| 15            | 2,11                | 47            | 3,23                |
| 16            | 2,04                | 48            | 2,70                |
| 19            | 1,85                | 49            | >4,70               |
| 22            | 2,49                | 50            | 1,60                |
| 23            | 3,28                | 51            | 2,90                |
| 24            | 3,34                | 52            | 2,15                |
| 25            | 2,85                | 54            | 2,18                |
| 26            | 2,60                | 58            | 2,00                |
| 27            | 1,48                | 59            | 2,30                |
| 30            | 2,05                | 60            | 3,26                |
| 31            | 2,38                | 61            | 3,36                |
| 32            | 1,00                | 62            | >4,70               |
| 33            | 2,70                | 63            | 2,90                |
| 35            | 1,00                | 64            | 2,00                |
| 38            | 2,60                | 65            | 2,48                |
| 39            | 1,00                | 66            | 2,30                |
| 40            | 2,70                | 67            | 3,11                |
| 41            | 3,34                | 68            | 2,30                |
| 42            | 2,48                |               |                     |

Del total de muestras de leche de cabra procedente de distintas explotaciones y puntos de descarga (68 muestras) se aislaron 164 supuestas cepas de *S. aureus* basándonos en que presentaban una apariencia típica (colonias negras con halo de coagulación alrededor de la colonia) en el medio BR-RPF.

---

#### 4.- Incidencia de *Escherichia coli*.

La PCR de los enriquecimientos permitió detectar la presencia de *E. coli* en distintos tipos de muestras analizadas procedentes de explotaciones caprinas y puntos de descarga de leche.

Considerando el tipo de muestra respecto al total de las analizadas (242), la mayor presencia de *E. coli* se detectó en las muestras de leche (14,88 %), seguida de las muestras de heces (13,22 %), agua (4,13 %), pienso (2,48 %) y aire (0,83 %). En total se detectaron 42 (17,36 %) enriquecimientos de muestras contaminados con el gen *eae*, cuya distribución se muestra en la tabla I.6, y 45 (18,60 %) muestras contaminadas con alguno de los genes *stx1* o *stx2* o ambos (tabla I.7). El número de enriquecimientos contaminados con cepas clasificadas como STEC presentó una variabilidad en la prevalencia de los distintos genes como se puede observar en la tabla I.7.

Tabla I.6. Distribución de los enriquecimientos con detección únicamente del gen *eae*.

| Muestra         | Nº de muestras analizadas | Nº de enriquecimientos <i>eae</i> + |
|-----------------|---------------------------|-------------------------------------|
| Leche de tanque | 68                        | 20 (29,41 %)                        |
| Agua            | 42                        | 2 (4,76 %)                          |
| Aire            | 45                        | 0 (0 %)                             |
| Pienso          | 43                        | 3 (6,98 %)                          |
| Heces           | 44                        | 17 (38,64 %)                        |

Tabla I.7. Distribución de los enriquecimientos con presencia de algún gen *stx*.

|                      | <i>stx1</i>         |              | <i>stx2</i>  |              | <i>stx1/stx2</i> |              | Nº<br>enriquecimientos<br><i>stx</i> + |
|----------------------|---------------------|--------------|--------------|--------------|------------------|--------------|--|
|                      | <i>eae</i> +        | <i>eae</i> - | <i>eae</i> + | <i>eae</i> - | <i>eae</i> +     | <i>eae</i> - |  |
| Leche de tanque (68) | 2                   | 3            | 3            | 8            | 0                | 1            | 17 (25 %)                              |
| Agua (42)            | 1                   | 0            | 3            | 4            | 0                | 0            | 8 (19,05 %)                            |
| Aire (45)            | 0                   | 0            | 0            | 2            | 0                | 0            | 2 (4,44 %)                             |
| Pienso (43)          | 0                   | 1            | 0            | 2            | 0                | 0            | 3 (6,98 %)                             |
| Heces (44)           | 0                   | 4            | 8            | 3            | 0                | 0            | 15 (34,09 %)                           |
|                      | 3 (1,24 %)          | 8 (3,31 %)   | 14 (5,79 %)  | 19 (7,85 %)  | 0 (0,00 %)       | 1 (0,41 %)   |  |
|                      | 11 (4,55 %)         |              | 33 (13,64 %) |              | 1 (0,41 %)       |              |  |
| <b>TOTAL</b>         | <b>45 (18,60 %)</b> |              |              |              |                  |              |  |

Se recuperaron más de 1200 colonias de las 242 muestras, y de ellas 30 fueron consideradas EPEC y procedían de 26 (10,74 %) enriquecimientos distintos, mientras que 25 cepas, procedentes de 21 (6,68 %) enriquecimientos, presentaban genes *stx* y se adscribieron a STEC.

Considerando el tipo de muestra de la que se partió para llevar a cabo el aislamiento selectivo de las 55 cepas, la mayoría de ellas se aislaron de muestras de heces, 27 cepas (50 %), seguidas de las aisladas en leche de tanque, 18 cepas (33,3 %), en pienso siete cepas (13 %) y en agua dos cepas (3,7 %). No se aisló ninguna cepa de muestras de aire. La distribución de las cepas EPEC aisladas se representa en la tabla I.8. La distribución de las cepas 25 cepas STEC aisladas de los distintos tipos de muestra y de los distintos genes detectados en ellas se representa en la tabla I.9.

Tabla I.8. Distribución de las cepas de EPEC aisladas en los distintos tipos de muestras analizadas.

| Muestra         | Nº de muestras analizadas | Nº de cepas EPEC |
|-----------------|---------------------------|------------------|
| Leche de tanque | 68                        | 9 (8,82 %)       |
| Agua            | 42                        | 0 (0 %)          |
| Aire            | 45                        | 0 (0 %)          |
| Pienso          | 43                        | 3 (6,98 %)       |
| Heces           | 44                        | 18 (40,91 %)     |

Tabla I.9. Distribución de las cepas STEC aisladas en los distintos tipos de muestras analizadas y de los genes que contiene cada una de ellas.

|                      | <i>stx1</i>         |              | <i>stx2</i>  |              | <i>stx1/stx2</i> |              | Nº cepas STEC |
|----------------------|---------------------|--------------|--------------|--------------|------------------|--------------|---------------|
|                      | <i>eae +</i>        | <i>eae -</i> | <i>eae +</i> | <i>eae -</i> | <i>eae +</i>     | <i>eae -</i> |               |
| Leche de tanque (68) | 1                   | 0            | 2            | 3            | 1                | 2            | 9 (13,24 %)   |
| Agua (42)            | 1                   | 0            | 0            | 0            | 0                | 1            | 2 (4,76 %)    |
| Aire (45)            | 0                   | 0            | 0            | 0            | 0                | 0            | 0 (0 %)       |
| Pienso (43)          | 0                   | 0            | 2            | 1            | 1                | 0            | 4 (9,30 %)    |
| Heces (44)           | 0                   | 3            | 2            | 2            | 1                | 2            | 10 (22,73 %)  |
|                      | 2 (0,83 %)          | 3 (1,24 %)   | 6 (2,48 %)   | 6 (2,48 %)   | 3 (1,24 %)       | 5 (2,07 %)   |               |
|                      | 5 (2,07 %)          |              | 12 (4,96 %)  |              | 8 (3,31 %)       |              |               |
| <b>TOTAL</b>         | <b>25 (10,33 %)</b> |              |              |              |                  |              |               |

En cuanto a las muestras procedentes de pacientes del hospital de León, de un total de 426 muestras procesadas, se aislaron nueve (2,11 %) cepas EPEC y cuatro (0,94 %) cepas STEC. De las cepas clasificadas como STEC, una poseía únicamente el gen *stx1*, dos el gen *stx2*, y otra los genes *stx1*, *stx2* y *eae*.

## DISCUSIÓN.

El valor de la mediana obtenido en el recuento de microorganismos mesófilos en nuestras las de leche de cabra de tanque analizadas (4,7 log ufc/ml) es similar al obtenido por Mühlherr et al. (2003) también en leche de tanque de explotaciones caprinas del territorio suizo (4,69 log ufc/ml). Sin embargo el intervalo observado en nuestro caso, 3,1 – 6,4 log ufc/ml, es más estrecho que en su caso, 2,0 – 8,64 log ufc/ml.

Las medias aritmética (MA) y geométrica (MG) del contenido de gérmenes mesófilos en todas las muestras analizadas en números absolutos han sido de 300000 ufc/ml y de 57000 ufc/ml respectivamente. Estos valores son similares a los obtenidos por Alcalde et al. (1999) en un grupo de rebaños de cabra de la Sierra Norte de Cádiz que incorporaron medidas para la mejora de la calidad higiénica cuya media aritmética es de 309000 ufc/ml, y a los obtenidos por Grasa et al. (2004) en 21 explotaciones de Cataluña cuyos recuentos fueron 96000 ufc/ml de MG en el periodo con mayores valores, otoño, y 50000 ufc/ml de MG en el periodo de recuentos inferiores, invierno. En cambio son inferiores a la media de todos los análisis realizados por el Laboratorio Interprofesional Lechero de la Comunidad Valenciana (LICOVAL) en el periodo de 1999 a 2001 (1359000 ufc/ml de MA y 426000 ufc/ml de MG) (Peris et al., 2002), a los obtenidos en la provincia de Almería por Acero et al. (2000), y a los obtenidos por Martínez-Navalón et al. (2002) en 18 rebaños de la Asociación de Ganaderos de Caprino de Raza Murciano-Granadina de la Comunidad Valenciana (AMURVAL) cuyos valores son 606000 ufc/ml (MA) y 198000 ufc/ml (MG).

Así mismo debemos destacar que el 84 % de las muestras tuvieron un recuento de gérmenes inferior a 500000 ufc/ml que es el límite legal vigente según el R. (CE) 853/2004 (Parlamento Europeo, 2004) cuando la leche cruda se destina a la elaboración de productos cuyo proceso de fabricación no incluye tratamiento térmico alguno, y el 91 % de las muestras se encontraban por debajo del límite establecido en 1500000 ufc/ml de gérmenes a 30 °C cuando la leche cruda se destina a la elaboración de leche de consumo tratada térmicamente o a la fabricación de productos lácteos a

---

base de leche tratada térmicamente, que es el destino más habitual de la leche procedente de las explotaciones muestreadas.

La prevalencia de los bajos recuentos de gérmenes a 30 °C se debe a unas buenas prácticas de manejo diario de las explotaciones que incluirían mayor cuidado de la higiene tanto de la explotación en general como de los animales, y de la máquina de ordeño. Los valores elevados en los recuentos microbiológicos podrían responder a situaciones puntuales en estas explotaciones debidas a problemas de mamitis u otras deficiencias higiénicas.

En cuanto a la presencia de *Cronobacter sakazakii* en nuestras muestras de leche de tanque no se detectó en ningún caso. Un resultado similar lo obtuvieron Lehner et al. (2010) que detectaron *C. sakazakii* en 172 muestras de leche en polvo pero nunca en muestras de leche cruda. Baumgartner y Niederhauser (2010), tras analizar 875 muestras de leche de tanque representativas de todo el territorio suizo se encontraron con el mismo resultado, no fueron capaces de aislar este microorganismo en la leche cruda.

El desconocimiento del hábitat natural de *C. sakazakii* se debe a que se ha detectado este microorganismo tanto en el medio ambiente como en alimentos. Numerosos estudios han aislado *C. sakazakii* tanto en alimentos como en leche en polvo, queso, alimentos infantiles, carne picada, salchichas, vegetales, y sobre todo en alimentos deshidratados. También se ha detectado en instalaciones dónde se fabrica la leche en polvo, en ambientes hospitalarios y en diversos fluidos corporales. Sin embargo, al igual que ocurre con las muestras de leche fresca, en otros entornos ambientales como son aguas superficiales, suelos, lodo, madera podrida, excrementos de pájaros, animales domésticos, ganado y leche de vaca no se ha conseguido detectar este microorganismo (Drudy et al., 2006).

Si bien es cierto que *C. sakazakii* se ha aislado de numerosas fuentes entre las que se incluyen diversas fórmulas infantiles elaboradas a partir de leche, los resultados obtenidos en este estudio sugieren que la fuente de contaminación podría no ser la leche sino otros componentes o la falta de medidas higiénicas en las instalaciones del proceso de fabricación. Se ha detectado la presencia de *C. sakazakii* en numerosos

ingredientes desecados que podrían emplearse en la fabricación de las fórmulas infantiles, además de la leche en polvo (Iversen & Forsythe, 2004). Además, algunos autores, como Beuchat et al. (2009) han observado el aumento de la resistencia de este microorganismo a los desinfectantes mediante la desecación o la formación de biofilm sobre las superficies de acero inoxidable lo que podría contribuir a su persistencia en las instalaciones de la industria alimentaria.

En base a los datos obtenidos, se puede considerar que la leche de cabra obtenida en las explotaciones muestreadas no representa un riesgo de transmisión de *C. sakazakii*.

La presencia de *S. aureus* en un el 66 % de las muestras analizadas es un resultado superior al detectado por Mühlherr et al. (2003) en leche de tanque de explotaciones caprinas en Suiza, cuya tasa de prevalencia fue del 31,7 % e inferior al observado por Jørgensen et al. (2005a) que observaron la presencia de este microorganismos en un 96,2 % en muestras de tanque de leche de explotaciones caprinas y en un 75 % en muestras de leche de tanque de explotaciones vacunas.

De las 68 muestras analizadas ninguna supera el máximo ( $10^5$  ufc/g) establecido en el Reglamento 2073/2005 (Comisión Europea, 2005) para la elaboración de quesos a base de leche cruda. Sesenta y seis muestras presentaban recuentos inferiores al límite mínimo ( $10^4$  ufc/g) y solo dos muestras (3 %) presentaban recuentos situados entre los límites establecidos en dicho Reglamento. En uno de los casos podría tratarse de una contaminación puntual ya que en un muestreo posterior llevado a cabo en la misma explotación no se detectó la presencia de *S. aureus*. De la segunda explotación con un elevado índice de *S. aureus* no se dispone de más datos.

Se ha propuesto que la infección de la glándula mamaria es la principal fuente de contaminación de la leche de tanque de origen vacuno con *S. aureus*. Esto sugiere que pudiera ocurrir lo mismo en el caso de las explotaciones caprinas, pero estudios posteriores han comprobado que la mamitis en las cabras es menos frecuente que en el caso de las vacas, incluso hasta un 50 % (Jørgensen et al., 2005a). Dado que en general, la presencia de *S. aureus* es mayor en los tanques de leche de origen caprino que de origen vacuno, algunos autores sugieren que las infecciones intramamarias no

---

sean la única y principal fuente de contaminación de la leche presente en los tanques (Jørgensen et al., 2005a).

En cualquier caso, los recuentos encontrados en este trabajo no representan valores que puedan suponer un peligro en la leche cruda de cabra, pero sí es necesario tenerlos presentes a la hora de elaborar productos derivados, ya que si se producen situaciones que permitan su multiplicación, se podrían superar los niveles considerados peligrosos para la producción de enterotoxinas.

Se ha comprobado que la leche cruda de cabra es un vehículo potencial para la transmisión de tipos patógenos de *E. coli* a los humanos. La prevalencia de EPEC en nuestras muestras de leche de tanque (13,23 %) es similar a la observada por Otero et al. (2013) en leche de tanque procedente de explotaciones ovinas cuya incidencia es de 14,17 %. Sin embargo es superior a la encontrada por Mohammadi y Abiri (2013) al analizar muestras de leche de tanque de explotaciones vacunas de Kermanshah (Irán). Estos autores observaron que el 8,25 % de las muestras estaban contaminadas con EPEC.

En cuanto a la prevalencia de STEC en nuestras muestras de leche de tanque (13,23 %) es ligeramente inferior a la observada por Mühlherr et al. (2003) quienes detectaron este microorganismo en un 16 % de las muestras de leche de cabra analizadas, pero superior a la reseñada por Rey et al. (2006) tras analizar muestras de leche de explotaciones de cabra y oveja y fábricas lácteas, cifrando la presencia de STEC en el 10,8 % de las muestras. Además estos resultados están muy por encima de los hallados por Klie et al. (1997) y Jarayao y Henning (2001) que reportan unas prevalencias de 3,9 % y 3,8 % respectivamente en muestras de leche.

Nuestros resultados obtenidos en explotaciones de caprino difieren tanto para STEC como para EPEC de los observados por Cortés et al. (2005) quienes tras analizar 12 granjas caprinas en la región de Murcia (España) no detectaron ninguno de los dos tipos de *E. coli* en las muestras de tanque de leche, pero sí en muestras fecales de los animales estudiados, dónde observaron una elevada prevalencia de STEC (47,7 %) y de EPEC (7,7 %). La presencia de STEC en muestras fecales de ganado es bastante frecuente como lo demuestran numerosos estudios. En España se han detectado en un

36 % del ganado ovino, en Alemania los resultados de otro estudio muestran la presencia de estas cepas en un 56 % de las cabras y un 67 % de las ovejas, en Australia se han identificado en un 40 % de las cabras y entre un 56 y un 73 % de las ovejas y en Reino Unido en un 43 % de las ovejas (Blanco et al., 2003). Estos resultados están en concordancia con los mostrados en este estudio, ya que la prevalencia de STEC encontrada en heces es del 40 %. Sin embargo la prevalencia de EPEC en heces (60 %) es superior a la detectada por Cortés et al. (2005), esto puede deberse a que en nuestro estudio, para la detección de estos microorganismos, se tomaron muestras de heces en el suelo y no mediante hisopo rectal como ocurre en la mayoría de los estudios anteriores, puesto que lo que se buscaba era determinar la prevalencia de estas bacterias en el ambiente donde habitan las cabras.

A pesar de que es bien conocido que los humanos son el principal reservorio de EPEC (Nataro & Kaper, 1998), la aparición cada vez más frecuente de nuevas cepas atípicas en animales y alimentos de origen animal (Bandyopadhyay et al., 2012; da Silva et al., 2001; Díez et al., 2009; Hernandez et al., 2009b; Trabulsi et al., 2002) ha hecho pensar que este tipo de cepas podrían ser las causantes de algunos casos clínicos de gastroenteritis en humanos. Hasta el momento pocos son los estudios realizados en los que se analiza la prevalencia de este tipo de cepas EPEC atípicas en humanos y su posible relación con la transmisión por alimentos. En nuestro estudio el 2,11 % de las muestras clínicas procedentes de casos de gastroenteritis diagnosticados en el Hospital Universitario de León en el periodo de estudio se corresponden con este patotipo de *E. coli*.

Una frecuencia menor que en el caso de las cepas EPEC se obtuvo para el patotipo STEC. El 0,94 % de las muestras analizadas procedentes de casos de gastroenteritis diagnosticados en el Hospital Universitario de León presentaba este tipo de cepas, un porcentaje superior al recogido en el Servicio de Información Microbiológica. En el informe presentado por este organismo, elaborado a partir de los datos suministrados por 55 laboratorios de 12 Comunidades Autónomas, durante los años 2010, 2011 y 2012 se registraron 66 aislamientos de *E. coli* STEC entre 32684 casos de gastroenteritis por bacterias (0,2 %). Esta prevalencia desciende hasta el 0,012 % si nos centramos en cepas no-O157 (Iglesias Collar, 2013).

---

Aunque sabemos que las cepas STEC eae+ pueden ser más patógenas (Yu & Kaper, 1992), el aislamiento de cepas clínicas STEC eae-, pone de manifiesto que las cepas eae- son significativas como agentes de gastroenteritis. Además un tipo de cepas EPEC, las atípicas, que generalmente se relacionan con reservorios en animales, se ha visto que están estrechamente relacionadas con las cepas STEC en características genéticas, serotipos, reservorio y otros factores epidemiológicos, y están emergiendo como patógenos en países desarrollados (Trabulsi et al., 2002). Estos datos nos sugieren que no se debe de bajar la guardia en cuanto a vigilancia y búsqueda de los reservorios de estos microorganismos.

En resumen, los datos obtenidos en este capítulo permiten afirmar que la leche de cabra presenta una calidad higiénica razonable y no supone un riesgo elevado de transmisión de *C. sakazakii* y *S. aureus*. Sin embargo, la presencia de tipos patógenos de *E. coli* es preocupante y es necesario tenerlo en cuenta para implantar medidas de control.

## **BIBLIOGRAFÍA.**

- Acero, M., Morales, M. B. L., Garrido, M., García, R., Consuegra, A., 2000. Estudio de la calidad y aptitud tecnológica de la leche de cabra en la provincia de Almería. Industrias Lácteas Españolas. 54-56.
- Alcalde Aldea, M. J., Delgado Pertiñez, M., Guzmán Guerrero, J. L., Rodríguez Martínez, B., Mena Guerrero, Y., Castel Genís, J. M., Caravaca Rodríguez, F., 1999. Calidad higiénico-sanitaria de la leche de cabra en la Sierra Norte de Cádiz: Situación según las condiciones de manejo. Calidad de la Leche y Queso. 497-501.
- Bandyopadhyay, S., Lodh, C., Rahaman, H., Bhattacharya, D., Bera, A., Ahmed, F., Mahanti, A., Samanta, I., Mondal, D., Bandyopadhyay, S., 2012. "Characterization of shiga toxin producing (STEC) and enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) in raw yak (*Poephagus grunniens*) milk and milk products". Research in Veterinary Science. 93, 604-610.

- Baumgartner, A., Niederhauser, I., 2010. "Occurrence of *Cronobacter* spp. in raw milk". Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit. 5, 253-253.
- Baylis, C. L., 2008. "Growth of pure cultures of Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* in a range of enrichment media". Journal of Applied Microbiology. 105, 1259-1265.
- Beuchat, L.R., Kim, H., Gurtler, J.B., Lin, L., Ryu, J., Richards, G.M., 2009. "*Cronobacter sakazakii* in foods and factors affecting its survival, growth, and inactivation". International Journal of Food Microbiology. 136, 204-213.
- Blanco, M., Blanco, J., Mora, A., Rey, J., Alonso, J., Hermoso, M., Hermoso, J., Alonso, M., Dahbi, G., González, E., 2003. "Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from healthy sheep in Spain". Journal of Clinical Microbiology. 41, 1351-1356.
- Comisión Europea, 2005. REGLAMENTO (CE) Nº 2073/2005 DE LA COMISIÓN de 15 de noviembre de 2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. (DO L 338 de 22.12.2005, p. 1).
- Comisión Europea, 2011. REGLAMENTO (UE) Nº 517/2011 DE LA COMISIÓN de 25 de mayo de 2011 por el que se aplica el Reglamento (CE) Nº 2160/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo que respecta al objetivo de la Unión de reducción de la prevalencia de determinados serotipos de *Salmonella* en las gallinas ponedoras de la especie *Gallus gallus* y se modifican el Reglamento (CE) Nº 2160/2003 y el Reglamento (UE) Nº 200/2010 de la Comisión. (DO L 138 de 26.5.2011, p. 45).
- Cortes, C., De la Fuente, R., Blanco, J., Blanco, M., Blanco, J. E., Dhabi, G., Mora, A., Justel, P., Contreras, A., Sanchez, A., Corrales, J. C., Orden, J. A., 2005. "Serotypes, virulence genes and intimin types of verotoxin-producing *Escherichia coli* and enteropathogenic *E. coli* isolated from healthy dairy goats in Spain". Veterinary Microbiology. 110, 67-76.

- 
- da Silva, Z. N., da Cunha, A. S., Lins, M. C., Carneiro, L. de A., Almeida, Angela C. de F., Queiroz, M. L., 2001. "Isolation and serological identification of enteropathogenic *Escherichia coli* in pasteurized milk in Brazil". *Revista de Saúde Pública*. 35, 375-379.
- Díez, M. G., Meindl, K., Frässdorf, J., Wolf, S., Schalch, B., Busch, U., 2009. "Prevalence of enteropathogenic *Escherichia coli* in food and water in Bavaria in 2007". *Archiv für Lebensmittelhygiene*. 60 (2), 77-81.
- Drudy, D., Mullane, N., Quinn, T., Wall, P., Fanning, S., 2006. "*Enterobacter sakazakii*: an emerging pathogen in powdered infant formula". *Clinical Infectious Diseases*. 42, 996-1002.
- EFSA, 2014. "The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012". *EFSA Journal* 12. (2), 3547.
- Farber, J., Forsythe, S., 2008. "*Enterobacter sakazakii*", ASM Press, Washington, D. C, EE.UU.
- Friedemann, M., 2007. "*Enterobacter sakazakii* in food and beverages (other than infant formula and milk powder)". *International Journal of Food Microbiology*. 116, 1-10.
- Grasa, M., Álvarez, J., Villalba, D., Molina, E., Such, X., 2004. Seguimiento del programa de mejora de la calidad de la leche cruda en las explotaciones de la Asociación de Ganaderos de Caprino de Cataluña. En XXIX Jornadas Científicas y VIII Internacionales de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia. 156-157.
- Healy, B., Cooney, S., O'Brien, S., Iversen, C., Whyte, P., Nally, J., Callanan, J. J., Fanning, S., 2010. "*Cronobacter (Enterobacter sakazakii)*: an opportunistic foodborne pathogen". *Foodborne Pathogens and Disease*. 7, 339-350.

- Hernandes, R. T., Elias, W. P., Vieira, M. A., Gomes, T. A., 2009. "An overview of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*". FEMS Microbiology Letters. 297, 137-149.
- Iglesias Collar, E., 2013. Incidencia de *E. coli* productor de toxinas Shiga y *E. coli* enteropatógeno y evaluación comparativa con cepas de origen clínico. En Evaluación del riesgo asociado a la presencia de bacterias patógenas en carnes frescas y productos cárnicos listos para el consumo comercializados en la ciudad de León. 161 – 206.
- Iversen, C., Forsythe, S., 2004. "Isolation of *Enterobacter sakazakii* and other Enterobacteriaceae from powdered infant formula milk and related products". Food Microbiology. 21, 771-777.
- Iversen, C., Forsythe, S., 2003. "Risk profile of *Enterobacter sakazakii*, an emergent pathogen associated with infant milk formula". Trends in Food Science and Technology. 14, 443-454.
- Jayarao, B. M., Henning, D. R., 2001. "Prevalence of Foodborne Pathogens in Bulk Tank Milk". Journal of Dairy Science. 84, 2157-2162.
- Jørgensen, H., Mørk, T., Høgåsen, H., Rørvik, L., 2005. "Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in bulk milk in Norway". Journal of Applied Microbiology. 99, 158-166.
- Klie, H., Timm, M., Richter, H., Gallien, P., Perlberg, K. W., Steinruck, H., 1997. "Detection and occurrence of verotoxin-forming and/or shigatoxin producing *Escherichia coli* (VTEC and/or STEC) in milk". Berliner und Munchener tierärztliche Wochenschrift. 110, 337-341.
- Lehner, A., Stephan, R., Fanning S., Iversen, C., 2011. "*Enterobacter*". En Dongyou Liu (Ed.), "Molecular detection of human bacterial pathogens". CRC Press, Taylor and Francis Group. Boca Raton, Florida, EE. UU. 853 - 868.
- Lehner, A., Fricker-Feer, C., Gschwend, K., Stephan, R., 2010. "Identification of Enterobacteriaceae and *Cronobacter* spp. in raw milk, milk concentrate and milk powder: prevalence and genotyping". Archiv für Lebensmittelhygiene. 5, 22-26.

- 
- Martínez Navalón, B., Ribelles Villar, A., Celda Ruiz, M. F., Peris Ribera, C., 2002. Calidad higiénico-sanitaria de la leche de cabra en los rebaños de la Asociación de Ganaderos de Caprino de raza Murciano-Granadina de la Comunidad Valenciana. En XXVII Jornadas Científicas y VI Jornadas Internacionales de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia. 301-307.
- Mohammadi, P., Abiri, R., 2013. "Isolation of Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) from raw milk in Kermanshah by polymerase chain reaction (PCR)". Jundishapur Journal of Microbiology. 6, e5439.
- Mohan Nair, M. K., Venkitanarayanan, K. S., 2006. "Cloning and sequencing of the *ompA* gene of *Enterobacter sakazakii* and development of an *ompA*-targeted PCR for rapid detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula". Applied and Environmental Microbiology. 72, 2539-46.
- Mühlherr, J. E., Zweifel, C., Corti, S., Blanco, J., Stephan, R., 2003. "Microbiological quality of raw goat's and ewe's bulk-tank milk in Switzerland". Journal of Dairy Science. 86, 3849-3856.
- Nataro, J. P., Kaper, J. B., 1998. "Diarrheogenic *Escherichia coli*". Clinical Microbiology Reviews. 11, 142-201.
- Oliver, S. P., Boor, K. J., Murphy, S. C., Murinda, S. E., 2009. "Food safety hazards associated with consumption of raw milk". Foodborne Pathogens and Disease. 6, 793-806.
- Oliver, S. P., Jayarao, B. M., Almeida, R. A., 2005. "Foodborne pathogens in milk and the dairy farm environment: food safety and public health implications". Foodborne Pathogens and Disease. 2, 115-129.
- Olsen, J. E., 1995. "Probes and polymerase chain reaction for detection of food-borne bacterial pathogens". International Journal of Food Microbiology 28, 1-78.
- Oswald, E., Schmidt, H., Morabito, S., Karch, H., Marchès, O., Caprioli, A., 2000. "Typing of intimin genes in human and animal enterohemorrhagic and enteropathogenic

*Escherichia coli*: Characterization of a new intimin variant”. Infection and Immunity. 68, 64-71.

Otero, V., Rodríguez-Calleja, J. M., Otero, A., García-López, M. L., Santos, J. A., 2013. “Genetic characterization of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* isolates from ewes’ milk, sheep farm environments, and humans by multilocus sequence typing and pulsed-field gel electrophoresis”. Applied and Environmental Microbiology.

Pagotto, F., Abdesselam, K., 2007. “*Enterobacter sakazakii*”. En M. P. Doyle and R. L. Buchanan (Ed.), Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers. ASM Press, Washington, D.C., EE.UU. 311 - 337.

Parlamento Europeo, 2004. REGLAMENTO (CE) Nº 853/2004 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 29 de abril de 2004 por el que se establecen normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal. (DO L 139 de 30.4.2004, p. 55).

Peris, C., Segura, C., Palomares, J., Rodríguez, M., Díaz, J., Fernández, N., 2002. La calidad de la leche de cabra producida en las Comunidades Autónomas de Valencia y Murcia. En XXVII Jornadas Científicas y VI Jornadas Internacionales de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia. 360-366.

Pollard, D. R., Johnson, W. M., Lior, H., Tyler, S. D., Rozee, K. R., 1990. “Rapid and specific detection of verotoxin genes in *Escherichia coli* by the polymerase chain reaction”. Journal of Clinical Microbiology. 28, 540-545.

Rey, J., Sánchez, S., Blanco, J., Hermoso de Mendoza, J., Hermoso de Mendoza, M., García, A., Gil, C., Tejero, N., Rubio, R., Alonso, J., 2006. “Prevalence, serotypes and virulence genes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from ovine and caprine milk and other dairy products in Spain”. International Journal of Food Microbiology. 107, 212-217.

SIM, 2014. Informe anual del sistema de información microbiológica 2012. Instituto de Salud Carlos III.

---

(<http://gesdoc.isciii.es/gesdoccontroller?action=download&id=10/03/2014-ada00c92a0>).

SIM, 2003. Brotes de enfermedades transmitidas por alimentos. España 1994 - 2003. Instituto de Salud Carlos III. (<http://www.isciii.es/ISCIII/es/contenidos/fd-servicios-cientifico-tecnicos/fd-vigilancias-alertas/fd-brotes/Informedebrotesalimentarios.pdf>)

Trabulsi, L. R., Keller, R., Tardelli Gomes, T. A., 2002. "Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*". Emerging Infectious Diseases. 8, 508-513.

Vimont, A., Vernozy-Rozand, C., Delignette-Muller, M. L., 2006. "Isolation of *E. coli* O157:H7 and non-O157 STEC in different matrices: review of the most commonly used enrichment protocols". Letters in Applied Microbiology. 42, 102-8.

WHO., 2007. "*Enterobacter sakazakii* and other microorganisms in powdered infant formula: meeting report". Microbiological Risk Assessment Series 6.

Yu, J., Kaper, J., 1992. "Cloning and characterization of the *eae* gene of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7". Molecular Microbiology. 6, 411-417.



**CAPÍTULO II. CARACTERIZACIÓN DE *S. aureus*.**



## INTRODUCCIÓN.

### Biología de *S. aureus*.

*Staphylococcus aureus* es un coco inmóvil que mide aproximadamente de 0,5 a 1  $\mu\text{m}$  de diámetro, pero normalmente se organiza en agrupaciones de células dispuestas en distintos planos que le dan aspecto de racimo de uva. Pertenece a la familia Staphylococcaceae, género *Staphylococcus*. Es una bacteria Gram-positiva, anaerobia facultativa, catalasa positiva y dentro de los estafilococos pertenece al grupo de los coagulasa positivos, es decir, a aquellos que poseen la enzima coagulasa, capaz de coagular el plasma sanguíneo (Moroni et al., 2011; Murray et al., 2009).

Aunque podemos encontrar esta bacteria en el ambiente, principalmente se encuentra colonizando los epitelios y las mucosas de los mamíferos. Generalmente es una bacteria comensal que coloniza a los individuos a las pocas semanas de nacer y se considera parte de la microbiota normal. Sin embargo, tanto en individuos inmunocompetentes como en individuos inmunocomprometidos u hospitalizados puede ocasionar enfermedades que van desde lesiones superficiales en la piel (espinillas, orzuelos, celulitis, foliculitis, síndrome de la piel escaldada por estafilococos (SSSS), abscesos cutáneos,...) hasta infecciones más serias como neumonía, mastitis, meningitis, infecciones del tracto urinario (UTIs) y septicemia, e incluso osteomielitis y endocarditis en los casos más graves. En la actualidad las cepas de *S. aureus* resistentes a la metilina (MRSA) suponen una de las principales causas de infecciones nosocomiales y es importante también en algunos casos de infecciones adquiridas en la comunidad (King et al., 2006; Moroni et al., 2011; Zetola et al., 2005). *S. aureus* también es la bacteria responsable del síndrome del shock tóxico (TSS) mediante la liberación de superantígenos al torrente sanguíneo (Moroni et al., 2011).

Sin embargo, en el ámbito de la inocuidad de los alimentos, el principal papel desempeñado por *S. aureus* en los casos de intoxicaciones alimentarias se debe a la capacidad que tiene de producir enterotoxinas. Los síntomas más frecuentes que presentan los pacientes con una intoxicación alimentaria de este tipo son dolor abdominal, náuseas, vómitos y diarrea. Estos síntomas aparecen a partir de los 30

---

minutos tras la ingesta del alimento contaminado hasta transcurridas 8 horas, y normalmente remiten espontáneamente en las posteriores 24 horas (Dinges et al., 2000; Le Loir et al., 2003). En los casos más graves se requiere la hospitalización del paciente (Holmberg & Blake, 1984).

En animales, especialmente pequeños rumiantes, *S. aureus* es el principal patógeno causante de infecciones intramamarias. A pesar de que la mayoría de las mastitis asociadas a este microorganismo son de tipo subclínico (5-30 %), y tan solo un 5 % son clínicas, se debe tratar de controlar este patógeno por la gravedad que presentan los síntomas clínicos y el riesgo que existe de contaminación de la leche con niveles elevados de *S. aureus* o con las enterotoxinas que produce (Contreras et al., 2007).

Los principales factores de virulencia con los que cuenta *S. aureus* son: proteínas de superficie que promueven la colonización de los tejidos del huésped, proteínas que promueven la propagación de bacterias en los tejidos, propiedades bioquímicas que mejoran su supervivencia en los fagocitos (producción de catalasa, carotenoides), factores superficiales que inhiben la fagocitosis (cápsulas, proteína A), “disfraces/camufajes” inmunológicos (proteína A, coagulasa, producción de biofilm, factor de aglutinación), toxinas capaces de lisar las membranas de las células eucariotas (hemolisina, leucotoxina), exotoxinas que dañan los tejidos del huésped y provocan los síntomas de la enfermedad (toxinas estafilocócicas, toxina del síndrome de shock tóxico, toxina exfoliativa), y mecanismos de resistencia antimicrobiana (Moroni et al., 2011). Toxinas estafilocócicas se han descrito 19 tipos basándose en la antigenicidad y en el modo de acción en el huésped. Han sido divididas en dos grupos: en el primer grupo se encuentran las clásicas toxinas eméticas, denominadas SEA, SEB, SEC<sub>1</sub>, SEC<sub>2</sub>, SEC<sub>3</sub>, SED y SEE, responsables de causar el 95 % de las intoxicaciones alimentarias estafilocócicas en humanos. Estas toxinas son resistentes a los procesos tecnológicos utilizados para garantizar la inocuidad de los alimentos como son el tratamiento térmico, y también, a las proteasas gastrointestinales, por lo que después de su absorción intestinal, el paciente puede desarrollar síntomas de intoxicación alimentaria, dependiendo de la toxina que haya sido ingerida. En el segundo grupo se encuentran las toxinas implicadas en el 5 % de las intoxicaciones alimentarias

estafilocócicas, recientemente identificadas, SEF, SEG, SEH, SEI, SEJ, SEK, SEL, SEM, SEN, SEO, SEP, SEQ, SER y SEU (Chiang et al., 2008; Dinges et al., 2000). En cuanto al mecanismo de resistencia antimicrobiana se han diferenciado dos grupos importantes de *S. aureus*, los resistentes a la meticilina (MRSA), de mayor importancia clínica, y los que no tienen esta capacidad, pero que son importantes desde el punto de vista de la producción de toxinas que pudieran llegar a contaminar los alimentos. En condiciones *in vivo* algunas cepas son capaces de formar biofilms, una fina capa mucosa que les ayuda en la adherencia y colonización del epitelio de la glándula mamaria del individuo, y también se ha asociado con una reducción de la susceptibilidad a los antibióticos (Vasudevan et al., 2003).

En el caso de las infecciones, tanto en los animales como en el ser humano el mecanismo de patogenicidad de *S. aureus* sigue el patrón descrito para la mayoría de los microorganismos patógenos, colonización del tejido, invasión, escape de las defensas del hospedador y resistencia a los antibióticos en el caso de los MRSA, y multiplicación en las células del hospedador. Siempre que ocurre una intoxicación alimentaria en la que esté implicado este microorganismo, se debe a que, el producto o alguno de sus ingredientes, contenía enterotoxinas estafilocócicas producidas por cepas de *S. aureus* debido, a que, entre otras causas, se mantuvieron durante cierto tiempo a temperaturas que permitieron su crecimiento y la síntesis. En ciertos alimentos elaborados como son leche o algunos tipos de queso, las contaminaciones por *S. aureus* de origen animal son más frecuentes. En otros, como los productos cárnicos curados y cocidos, se deben al manipulador o a la capacidad que posee este microorganismo de formar biofilms sobre las superficies de los materiales empleados para su elaboración. En ambos casos los animales y el hombre están infectados o son portadores (Tirado & Schmidt, 2001).

## **Caracterización molecular.**

Las especies bacterianas presentan suficiente diversidad interna como para permitir la identificación de distintos clones o grupos clónicos (cepas que tienen un alto grado de afinidad) entre aislamientos de las mismas cepas recolectadas a tiempos

---

distintos y con diversos orígenes. Esta identificación, también llamada tipificación, es muy útil en estudios ecológicos y epidemiológicos. Tradicionalmente la tipificación se llevaba a cabo por métodos fenotípicos, que permitían una observación sencilla de algunas reacciones diferenciales, pero en los últimos años, la aparición de técnicas de tipificación molecular, basadas en la composición de las moléculas biológicas, y los métodos genotípicos, basados en los ácidos nucleicos, han permitido mejorar los resultados (Mossel et al., 2003).

Tanto los métodos moleculares como los genotípicos son atractivos porque tienen una alta capacidad de discriminación, son reproducibles, aplicables a todas las cepas y permiten una evaluación objetiva de los resultados además del análisis estadístico de los datos, pero, como contrapartida, se necesita un equipamiento que no está disponible en muchos laboratorios de rutina de análisis de alimentos, y los protocolos deben de ser estandarizados y validados para poder llevar a cabo las comparaciones oportunas y poder establecer la relación entre las distintas cepas (Mossel et al., 2003).

Una de las técnicas de tipificación genotípica de uso común es el análisis de los polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción generados a partir de regiones de ADN amplificadas por reacción en cadena de la polimerasa (PCR - RFLP). Esta técnica se basa en secuencias específicas de nucleótidos que son reconocidas y cortadas por las enzimas de restricción en un proceso de digestión y que posteriormente se separan mediante electroforesis en geles de agarosa proporcionando un patrón de bandas único para cada ADN, lo que permite diferenciar cepas o individuos distintos en base a dichos patrones. A pesar de ser una técnica laboriosa, se emplea bastante por ser fácil de diseñar, no requiere un instrumental caro y permite observar diferencias en inserciones o deleciones desde 1 hasta 50 nucleótidos (Rasmussen, 2012). En el caso de *S. aureus*, se utiliza esta técnica con el gen que codifica para la coagulasa, proteína que producen prácticamente todas las cepas de *S. aureus* y cuya detección es uno de los principales criterios empleados en los laboratorios de microbiología clínica para la identificación de este microorganismo (Hookey et al., 1998).

Otra técnica más laboriosa que también permite mostrar la relación genética entre las distintas cepas es la electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE). Esta técnica se basa en la separación de grandes fragmentos de restricción de ADN cromosómico en un campo eléctrico para producir un patrón de restricción o huella digital en geles de agarosa. Este método basado en polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción se aplicó por primera vez en el estudio de *S. aureus* para ver la relación entre las cepas MRSA que infectaban a los pacientes en una unidad de cuidados intensivos de un hospital francés (Goering & Duensing, 1990). Se ha demostrado que la técnica PFGE es una herramienta muy útil en estudios epidemiológicos, ya que es altamente discriminatoria, sin embargo, surgen algunas dificultades cuando se trata de comparar huellas digitales complejas presentes en diferentes geles de agarosa o cuando se obtienen en distintos laboratorios. Para minimizar estos problemas se ha estandarizado la metodología y varios laboratorios europeos, así como los laboratorios americanos, emplean los protocolos descritos en la página de la red internacional de tipificación molecular para la vigilancia de las enfermedades transmitidas por los alimentos “PulseNet International” para los distintos microorganismos (Enright M. C., 2008; Goering, 2004).

En este capítulo se pretende abordar la caracterización de *S. aureus* que permita realizar una tipificación de las cepas con el fin de observar la relación existente entre los aislados de las distintas explotaciones y determinar la prevalencia de determinadas cepas en las subpoblaciones estudiadas.

## **MATERIAL Y MÉTODOS.**

### **1.- Microorganismos.**

Para la realización de los experimentos que se desarrollan en el presente capítulo se emplearon 164 cepas de *S. aureus* aisladas de muestras de leche de cabra siguiendo la metodología descrita en el capítulo anterior.

---

Además como controles positivos para la realización de las PCR se emplearon cepas suministradas por la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) (tabla II.1).

Tabla II.1. Cepas de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) empleadas como controles positivos en las reacciones de PCR.

| Nombre/Denominación    | Información adicional   |
|------------------------|---|
| CECT 976 (ATCC 13575)  | <b><i>Staphylococcus aureus</i> hemolítica</b>                      |
| CECT 976 (ATCC 13575)  | <b><i>Staphylococcus aureus</i> (hemolítica)<br/>Enterotoxina A</b> |
| CECT 4459              | <b><i>Staphylococcus aureus</i><br/>Enterotoxina B</b>              |
| CECT 4465 (ATCC 19095) | <b><i>Staphylococcus aureus</i><br/>Enterotoxina C</b>              |
| CECT 4466 (ATCC 23235) | <b><i>Staphylococcus aureus</i><br/>Enterotoxina D</b>              |
| CECT 5192              | <b><i>Staphylococcus aureus</i> (hemolítica)<br/>Enterotoxina E</b> |
| CECT 5190              | <b><i>Staphylococcus aureus</i> MRSA</b>                            |

## 2.- Extracción de ADN.

Partiendo de un cultivo fresco en caldo BHI (Oxoid) se extrajo el ADN. Para ello se transfirió 1 ml del caldo a un tubo estéril de 1,5 ml y se centrifugó durante 5 minutos a 15700 g en una microcentrífuga Eppendorf 5415 D (Eppendorf). Se descartó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 1 ml de Buffer Fosfato Salino 1X, (PBS) (Scharlau, Barcelona, España). Se centrifugó nuevamente durante 5 minutos a 15700 g, y tras retirar el sobrenadante se resuspendió el precipitado en 50 µl de agua Milli-Q estéril y 50 µl de lisostafina (100 µg/ml) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EE.UU.). Se incubó la solución durante 15 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se añadieron 2 µl de proteinasa K (20 mg/ml) (Sigma-Aldrich), se incubó nuevamente durante 1 hora a 60 °C y finalmente se centrifugó durante 5 minutos a 15700 g para que el ADN quedara en suspensión y precipitaran el resto de componentes de la muestra.

El ADN extraído se conservó a -20 °C.

### 3.-PCR.

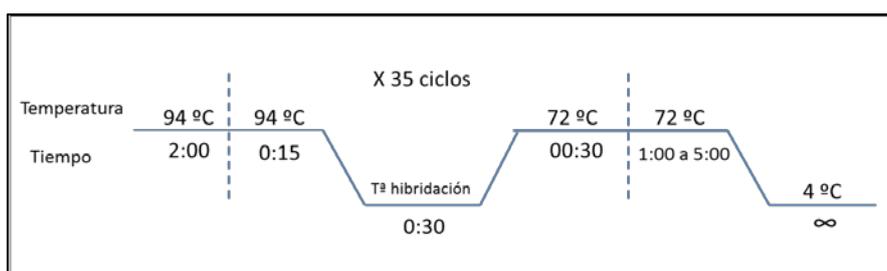
Se realizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para detectar varios genes relacionados con la patogenicidad de *S. aureus*. El gen *coa*, que codifica una proteína llamada coagulasa, que es un factor de virulencia importante, los genes *icaA* y *bap*, implicados en la capacidad de formación de biofilms, para el gen *mecA*, que interviene en la resistencia a la metilina, y para los genes que codifican varias enterotoxinas (SEA, SEB, SEC, SED y SEE).

Partiendo del ADN extraído como se describe en el apartado anterior, se llevó a cabo una PCR sencilla para cada uno de estos genes utilizando los pares de cebadores descritos en la tabla II.2.

Tabla II.2. Cebadores empleados en la amplificación de diversos genes de *S. aureus* (*coa*, *icaA*, *bap*, *mecA*, y los que codifican para las enterotoxinas).

| Gen diana   | Cebador | Secuencia (5'→3')           | Tamaño (pb) | T <sup>a</sup> hibridación | Referencia               |
|-------------|---------|-----------------------------|-------------|----------------------------|--------------------------|
| <i>coa</i>  | Coag1   | ATAGAGATGCTGGTACAGG         | variable    | 57 °C                      | (Hookey et al., 1998)    |
|             | Coag2   | GCTTCCGATTGTTTCGATGC        |             |                            |                          |
| <i>icaA</i> | icaA-F  | TCTCTTGCAGGAGCAATCAA        | 188         | 55,5 °C                    | (Arciola et al., 2001)   |
|             | icaA-R  | TCAGGCACTAACATCCAGCA        |             |                            |                          |
| <i>bap</i>  | bap-6m  | CCCTATATCGAAGGTGTAGAATTGCAC | 971         | 42 °C                      | (Cucarella et al., 2001) |
|             | bap-7c  | GCTGTTGAAGTTAATACTGTACCTGC  |             |                            |                          |
| <i>mecA</i> | mecA1   | GCAATCGCTAAAGAATAAG         | 240         | 56 °C                      | (Smyth et al., 2001)     |
|             | mecA2   | GGGACCAACATAACCTAATA        |             |                            |                          |
| <i>sea</i>  | ESA 1   | ACGATCAATTTTTACAGC          | 544         |                            |                          |
|             | ESA 2   | TGCATGTTTTTCAGAGTTAATC      |             |                            |                          |
| <i>seb</i>  | ESB 1   | GAATGATATTAATTCGCATC        | 416         |                            |                          |
|             | ESB 2   | TCTTTGTCGTAAGATAAACTTC      |             |                            |                          |
| <i>sec</i>  | ESC 1   | GACATAAAAGCTAGGAATTT        | 257         | 57 °C                      | (Rosec & Gigaud, 2002)   |
|             | ESC 2   | AAATCGGATTAACATTATCCA       |             |                            |                          |
| <i>sed</i>  | ESD 1   | TTACTAGTTTGTAATATCTCCTT     | 334         |                            |                          |
|             | ESD 2   | CCACCATAACAATTAATGC         |             |                            |                          |
| <i>see</i>  | ESE 1   | ATAGATAAAGTTAAAACAAGCAA     | 170         |                            |                          |
|             | ESE 2   | TAACTTACCGTGGACCC           |             |                            |                          |

Para llevar a cabo la PCR se emplearon los pares de cebadores correspondientes para cada gen, y con un volumen final de 50  $\mu$ l, se realizó una reacción compuesta por 1  $\mu$ l de cada cebador preparado a una concentración de 25  $\mu$ M, 20  $\mu$ l de Master mix (2,5X, 5-PRIME, Hamburgo, Alemania), 5  $\mu$ l de ADN muestra y 23  $\mu$ l de agua Milli-Q estéril. La amplificación del gen se realizó en un termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf) bajo las siguientes condiciones, modificando para cada gen la temperatura de hibridación:



Se comprobó la amplificación mediante electroforesis en gel de agarosa (US Biological, Swamscott, Massachusetts, EE.UU.) al 1,5 % en TAE 0,5X (Scharlau), empleando como tinción para los ácidos nucleicos RedSafe (iNtRON Biotechnology). Se visualizó el resultado de la electroforesis empleando un transiluminador de luz UV, Mini-Transilluminator (Bio-Rad, Hercules California, EE.UU.). Se fotografió empleando el sistema de documentación de geles Digimage System acoplado a una cámara digital Canon Power Shot G11 (Major Science, Taipei, Taiwan).

Para la determinación del tamaño de la banda obtenida tras la amplificación del gen que codifica para la coagulasa se empleó el software GelAnalyzer 2010 (<http://www.gelanalyzer.com/>).

#### 4.- Prueba de la coagulasa.

La coagulasa es una proteína producida por varios microorganismos que permite la conversión del fibrinógeno en fibrina, y contribuye a la coagulación del plasma sanguíneo. En el caso de *S. aureus* sirve para diferenciar este microorganismo de otros estafilococos (Forbes et al., 1998). Mediante el test de la coagulasa en tubo se

detecta tanto la coagulasa libre como la unida a la pared celular del microorganismo, también llamada factor de aglutinación.

Para realizar la prueba de la coagulasa a las supuestas cepas de *S. aureus* se partió de un cultivo fresco en BHI (Oxoid) incubado durante 18 horas a 37 °C. Se transfirieron 0,5 ml del cultivo a un tubo de ensayo estéril y en el mismo tubo se añadieron 0,5 ml de plasma citratado de conejo (Remel - Thermo Fisher Scientific, Lenexa, Kansas, EE.UU.) y se mezcló por agitación. La mezcla se incubó en un baño Unitronic 200 (J. P. Selecta, Barcelona, España) a 37 °C sin agitación y se comprobó la formación del coágulo de fibrina a los 30 minutos, a las 4 horas y a las 24 horas, categorizando su firmeza entre 0 (sin coagulación) y 4 (coagulación total) de acuerdo con la APHA (Lancette & Bennett, 2001).

## **5.- Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción amplificados mediante PCR (PCR-RFLP).**

Partiendo del amplificado del gen de la coagulasa generado mediante PCR siguiendo el procedimiento descrito anteriormente, se purificó el producto de amplificación empleando el kit comercial *NucleoSpin Gel and PCR Clean-up* (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante descritas a continuación.

A 50 µl de producto de la reacción de PCR se le añadieron 100 µl de *Binding Buffer NT1*. Se transfirió todo el volumen a una columna depositada previamente sobre un tubo de recolección. Se centrifugó en una microcentrífuga Eppendorf 5415D (Eppendorf) a 11000 g, 30 segundos para que el ADN se depositara en la membrana del filtro. Se descartó el precipitado y se lavó la membrana de sílice sobre la que queda retenido el ADN añadiendo 700 µl de *Washing Buffer NT3*. Se centrifugó nuevamente a 11000 g, 30 segundos y se descartó el precipitado. Se realizó un segundo lavado del mismo modo (se añadieron 700 µl de *Washing Buffer NT3* y se centrifugó a 11000 g, 30 segundos). Se secó la membrana mediante una centrifugación a 11000 g durante 1 minuto. Se transfirió la columna a un nuevo tubo estéril y se añadieron sobre la

---

membrana de sílice 35  $\mu$ l de agua Milli-Q estéril para eluir el ADN. Se incubó a temperatura ambiente durante 1 minuto. Se centrifugó a 11000 *g* 1 minuto. Se descartó la columna y se conservó el tubo que contiene el ADN eluido en agua.

Se cuantificó la concentración de ADN obtenido tras la purificación empleando un espectrofotómetro UV de microvolúmenes (Quawell Q3000; Quawell Technology Inc., California, EE.UU.).

La restricción del ADN se llevó a cabo a partir de aproximadamente 500 ng de ADN (5 a 10  $\mu$ l del producto de PCR purificado) (Hookey et al., 1998) sobre los que se añadieron 2  $\mu$ l del buffer de la enzima (10X FastDigest Green Buffer), (Fermentas - Thermo Scientific, Vilnius, Lituania), 1  $\mu$ l de endonucleasa FastDigest *Hha*I (Fermentas - Thermo Scientific) y la cantidad necesaria de agua Milli-Q para completar el volumen final de reacción (20  $\mu$ l). La reacción se incubó a 37 °C durante 15 minutos en un baño seco Thermomixer compact (Eppendorf).

Los fragmentos obtenidos en la digestión se analizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa 3 % en TAE 0,5X (Scharlau).

En el gel se cargaron 10  $\mu$ l del producto de PCR digerido y como marcador de peso molecular se emplearon 5  $\mu$ l de 100 pb *Blue extended DNA Ladder* (BIORON GmbH, Ludwigshafen, Alemania).

Se visualizó el resultado como ya se ha descrito en apartados anteriores.

Las imágenes se analizaron empleando el software GelCompar II 6.5 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Bélgica), utilizando como coeficiente de similitud el coeficiente de Dice, 3 % de optimización y 3 % de tolerancia, y usando el UPGMA como método para agruparlas.

## 6.- Electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE).

Se realizó la electroforesis en campo pulsado (PFGE) según el método propuesto por PulseNet (<http://www.pulsenetinternational.org>) (CDC, 2012). El protocolo de PFGE consiste en lo siguiente:

- **Preparación de los bloques (*plugs*) de agarosa a partir de cultivo puro en caldo BHI.**

Para llevar a cabo esta técnica se partió de 600 µl de cultivo puro de *S. aureus*, crecido en BHI (Oxoid) durante 18 horas a 37 °C, con una densidad óptica 0.9 – 1 medida a 610 nm de absorbancia en el espectrofotómetro Uvikon 810 (Kontron Analytical, Redwood City, California, EE.UU.). Tras centrifugar el tubo a 9300 g durante 3 minutos, se retiró el sobrenadante y se añadió 1 ml de *TEN buffer* (Tris HCl 0,1 M, NaCl 0,15 M y EDTA 0,1 M). Se centrifugó nuevamente a 9300 g durante 3 minutos, se retiró el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 300 µl de *EC buffer* (Tris HCl 6 mM, NaCl 1 M, EDTA 0,1 M, brij 0,5 %, desoxicolato 0,2 % y sarcosyl 0,5 %). Se añadieron 3 µl de lisostafina (1 mg/ml) (Sigma-Aldrich) y se agitó vigorosamente. Se añadieron 300 µl de agar *SeaKem Gold* (Lonza, Rockland, Maine, EE.UU.) 1,8 % y 1 % SDS en *TE* (Tris HCl 10 mM y EDTA 1 mM) precalentado a 60 °C, se mezcló bien con la pipeta y rápidamente se rellenaron los moldes para hacer los *plugs*, evitando la formación de burbujas. Se dejó solidificar la agarosa en los moldes durante 15 minutos a temperatura ambiente y 5 minutos a 4 °C.

- **Lisis celular.**

Se transfirió cada bloque de agarosa a un tubo de polipropileno de 15 ml debidamente identificado, en el cual se añadieron 3 ml de *EC buffer*, y se incubó a 37 °C en un baño de agua con agitación constante de 150 rpm, durante 4 horas. Transcurrido el tiempo se retiró el *EC buffer* y se añadieron 4 ml de *TE buffer* para lavar. Se incubó a temperatura ambiente y agitación de 150 rpm, durante 30 minutos. Se realizaron 4 lavados consecutivos con *TE buffer*, y finalmente, para guardar el *plug* hasta el momento de realizar la restricción, en el mismo tubo, se añadieron nuevamente 4 ml de *TE buffer* y se conservó a 4 °C.

---

- **Digestión del ADN.**

Para realizar la digestión del ADN se sacó el *plug* inmerso en *TE*, se cortó un tercio de él y se colocó en un nuevo tubo estéril de 1,5 ml. En el nuevo tubo que contiene el trozo de *plug* se añadieron 300 µl de una mezcla previamente preparada que contenía la enzima de restricción *Sma*I y *Bovine Serum Albumin* (BSA) al 0,1 %. Se incubó el *plug* en esta solución a 25 °C durante 3 horas en agitación (300 rpm) en un termobloque Thermomixer compact (Eppendorf).

- **Preparación del gel de agarosa y de la cubeta de electroforesis.**

Se preparó un gel de agarosa *SeaKem Gold* (Lonza) al 1 % en *buffer Tris-Borate EDTA* (TBE) 0,5X (Scharlau), que se fundió con ayuda de un microondas y se mantuvo atemperado a 60 °C hasta el momento de su uso.

Se montó el molde para hacer el gel, nivelándolo correctamente y sellando los bordes con agarosa fundida, y a continuación se colocaron los 13 *plugs* sobre el extremo del peine, uno en cada diente, fijándolos con una gota de agarosa fundida. En los peines de los extremos se colocó un marcador de peso molecular, que consistía en un *plug* de la cepa de *Salmonella* Braenderup H9812 (ATCC BAA-664) digerido según las condiciones descritas por PulseNet International (Ribot et al., 2006). Una vez solidificada la agarosa y, por lo tanto, sujetos los *plugs* al peine, éste se colocó sobre el molde y se vertió el resto de la agarosa dejando solidificar lentamente a temperatura ambiente durante 20 minutos.

Mientras solidificaba la agarosa se añadieron en la cubeta dos litros de TBE 0,5X (Scharlau) y se atemperó a 14 °C.

Una vez solidificado el gel se retiró el peine, se desmoldó y se colocó sobre la plataforma en la cubeta de electroforesis. Se cerró la tapa y se programaron las condiciones para llevar a cabo la electroforesis en el equipo CHEF DR III (Bio-Rad):

Pulso inicial: 5s

Pulso final: 40s

Voltaje: 6 V/cm

Ángulo de inclinación: 120°

Tiempo: 20 horas

- **Visualización del resultado.**

Transcurrido el tiempo de electroforesis se tiñó el gel sumergiéndolo en una cubeta con bromuro de etidio (Sigma-Aldrich) (10 mg/ml) durante 60 minutos y posteriormente se sumergió en otra cubeta con agua destilada durante 30 minutos. El resultado se visualizó del mismo modo descrito en apartados anteriores.

El análisis de las imágenes para la obtención del correspondiente dendrograma se realizó empleando el software GelCompar II 6.5 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Bélgica), utilizando como coeficiente de similitud Dice, 1 % de optimización y 1 % de tolerancia, y usando el UPGMA como método para agruparlas.

## **7.- Formación de biofilms.**

Se seleccionaron varias cepas aisladas y caracterizadas de *S. aureus* para realizar este ensayo. Siguiendo el protocolo descrito por Vasudevan et al. (2003), cada cepa se incubó durante 18 horas a 37 °C en medio TSB (Oxoid). A partir de ese cultivo se realizó una dilución 1:40 en TSB suplementado con 0,25 % de glucosa. Se inocularon placas de polipropileno estériles de 96 pocillos fondo en "U" con 200 µl de la suspensión diluida y se incubaron a 37 °C durante 24 horas. Posteriormente se lavó la placa 3 veces con 200 µl de PBS. Tras secar la placa se tiñó el fondo de los pocillos con 50 µl de cristal violeta al 1 % durante 15 minutos. Se lavó nuevamente la placa 3 veces con agua destilada estéril y tras secar a temperatura ambiente se midió la densidad óptica de los pocillos a 585 nm en un lector de microplacas Synergy HT (BIO-TEK, Winooski, Vermont, EE.UU.).

---

Las distintas muestras se realizaron por triplicado. Como control positivo se emplearon cepas pertenecientes a la colección del laboratorio y como control negativo se emplearon 200 µl de TSB suplementado con 0,25 % de glucosa.

## RESULTADOS.

### 1.-PCR.

Mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se investigó la presencia de varios genes relacionados con la patogenicidad de *S. aureus*.

De las 164 cepas aisladas como se describe en el Capítulo I, se comprobó que 144 cepas contienen el gen de la coagulasa, observándose un polimorfismo que nos permite identificar tres grupos de estafilococos coagulasa positivos claramente diferenciados en función del tamaño de banda amplificado mediante PCR. Estos tres grupos son: grupo 1 (840 pb), grupo 2 (760 pb) y grupo 3 (610 pb), siendo el polimorfismo más frecuente el que presenta un tamaño de 840 pb para el gen de la coagulasa (37 %, 53 de 144 cepas).

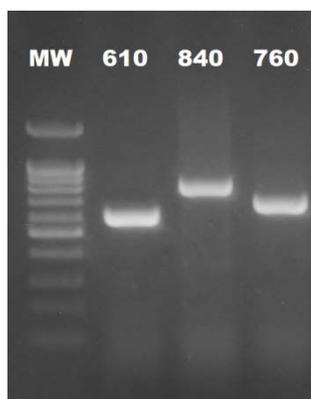


Figura II.1. Polimorfismo del gen de la coagulasa de *S. aureus*.

Los resultados de la amplificación de los genes *icaA* y *bap* mediante PCR implicados en la formación de biofilm fueron negativos para las 164 cepas estudiadas.

Resultados similares se obtuvieron al analizar el gen *mecA*, implicado en el mecanismo de resistencia a la meticilina. Ninguna de las 164 cepas estudiadas presentaba dicho gen.

En cuanto a la detección de alguna de las 5 enterotoxinas estudiadas, mediante PCR comprobamos que de las 164 cepas analizadas, una cepa (0,61 %) poseía el gen de la enterotoxina SB, cuatro (2,44 %) el gen de la enterotoxina SA, seis (21,95 %) el gen de la enterotoxina SD, y ninguna cepa presentaba el gen de la enterotoxina SC ni de la enterotoxina SE.

## 2.- Prueba de la coagulasa.

De las 164 cepas estudiadas, 140 (85,37 %) se consideraron claramente productoras de coagulasa. De ellas, más del 50 % presentaron un grado de coagulación alto (3 o 4) como se puede observar en la tabla II.3, donde además se representa el porcentaje de cepas correspondiente a cada grado de coagulación.

Tabla II.3. Relación de cepas de *S. aureus* asignadas a cada grado de coagulación según la prueba de coagulasa en tubo.

| Grado de coagulación                       | 0     | 1    | 2    | 3     | 4     |
|--|-------|------|------|-------|-------|
| Nº de cepas                                | 24    | 12   | 11   | 37    | 80    |
| % con respecto al total de cepas aisladas. | 14,63 | 7,32 | 6,71 | 22,56 | 48,78 |

La mayoría de los resultados positivos obtenidos (85 %) se pudieron observar antes de las 4 horas de incubación, y el resto (15 %) se confirmaron tras 24 horas.

## 3.- Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción amplificados mediante PCR (PCR-RFLP).

La restricción del ADN que codifica el gen de la coagulasa empleando la endonucleasa *HhaI* (isoesquízómero de *CfoI*) mostró como resultado los 12 patrones de bandas distintos que se muestran en la figura II.2. El número de fragmentos (bandas) generados varía entre 2 y 5. Quince de las 144 cepas estudiadas (10,42 %) no

podieron ser tipificadas por este método, bien porque los fragmentos amplificados no se digerían o porque no se apreciaban bandas discretas tras la restricción.

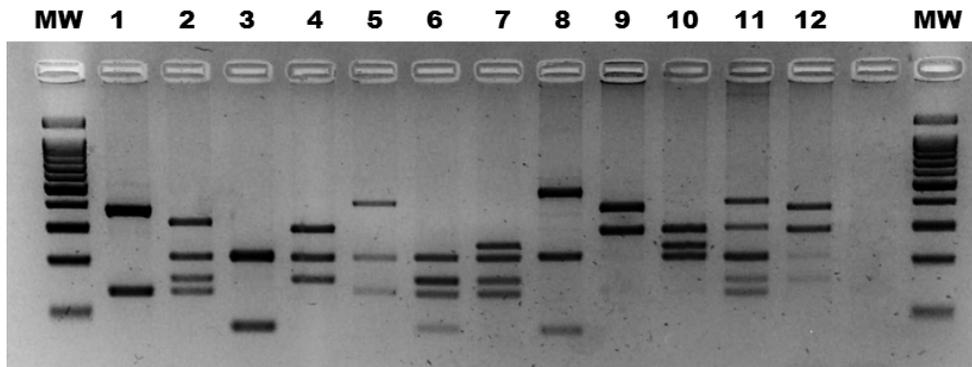


Figura II.2. Patrones de bandas obtenidos tras la restricción del gen de la coagulasa de *S. aureus* con endonucleasa *HhaI*.

Para las 129 cepas analizadas el perfil más frecuente se corresponde con el 2 (47 cepas, 36,43 %) seguido del 4 (26 cepas, 20,16 %), el 6 y el 9 (diez cepas cada uno, 7,75 %), el 5 (siete cepas, 5,43 %), el 1 (seis cepas, 4,65 %), el 7, 8 y 12 (cinco cepas cada uno, 3,88 %), el 10 (cuatro cepas 3,10 %), el 3 (cuatro cepas, 2,33 %) y el 11 (una cepa, 0,78 %).

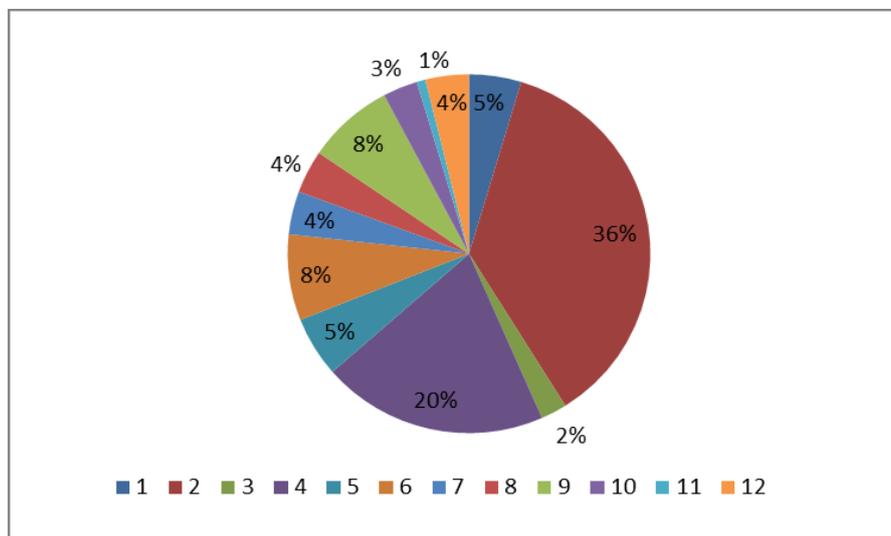
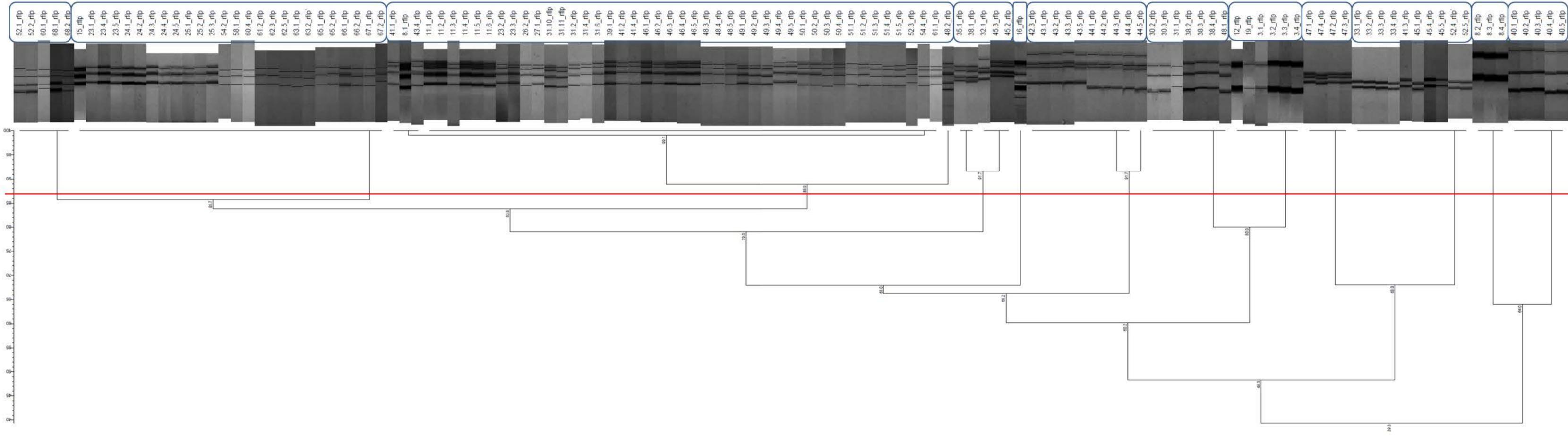


Figura II.3. Distribución de los patrones de restricción generados tras digerir el gen de la coagulasa de *S. aureus* con la endonucleasa *HhaI*.

El análisis, mediante el programa GelCompar II 6.5 (Applied Maths), de los distintos patrones obtenidos con esta técnica para las cepas nos generó un



dendrograma (figura II.4) en el que empleando el coeficiente de Dice, con índices de tolerancia y optimización igual a 3, y teniendo en cuenta un 78 % de similitud entre las cepas, se pueden observar 11 *clusters* y un perfil único, que en líneas generales coinciden con los 12 patrones mostrados en la figura II.3.

Figura II.4. Dendrograma resultado de la técnica RFLP para el gen de la coagulasa de las cepas de *S. aureus* aisladas de leche y explotaciones caprinas. (Ver página anterior)

---

#### **4.- Electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE).**

Mediante PFGE se caracterizaron 61 cepas. El dendrograma de la figura II.5 muestra los 55 patrones de bandas y las relaciones genéticas observadas tras la digestión del ADN con la enzima *Sma*I. Las cepas se agrupan en 8 *clusters* diferentes (letras A a H) y 27 perfiles únicos al 75 % de similitud. A pesar de la gran diversidad que se observa en general, podemos comprobar que existe un *cluster* (B) que agrupa a la mayoría de las cepas (17 cepas) con perfiles similares, siendo 12 de las cepas idénticas entre sí dos a dos.

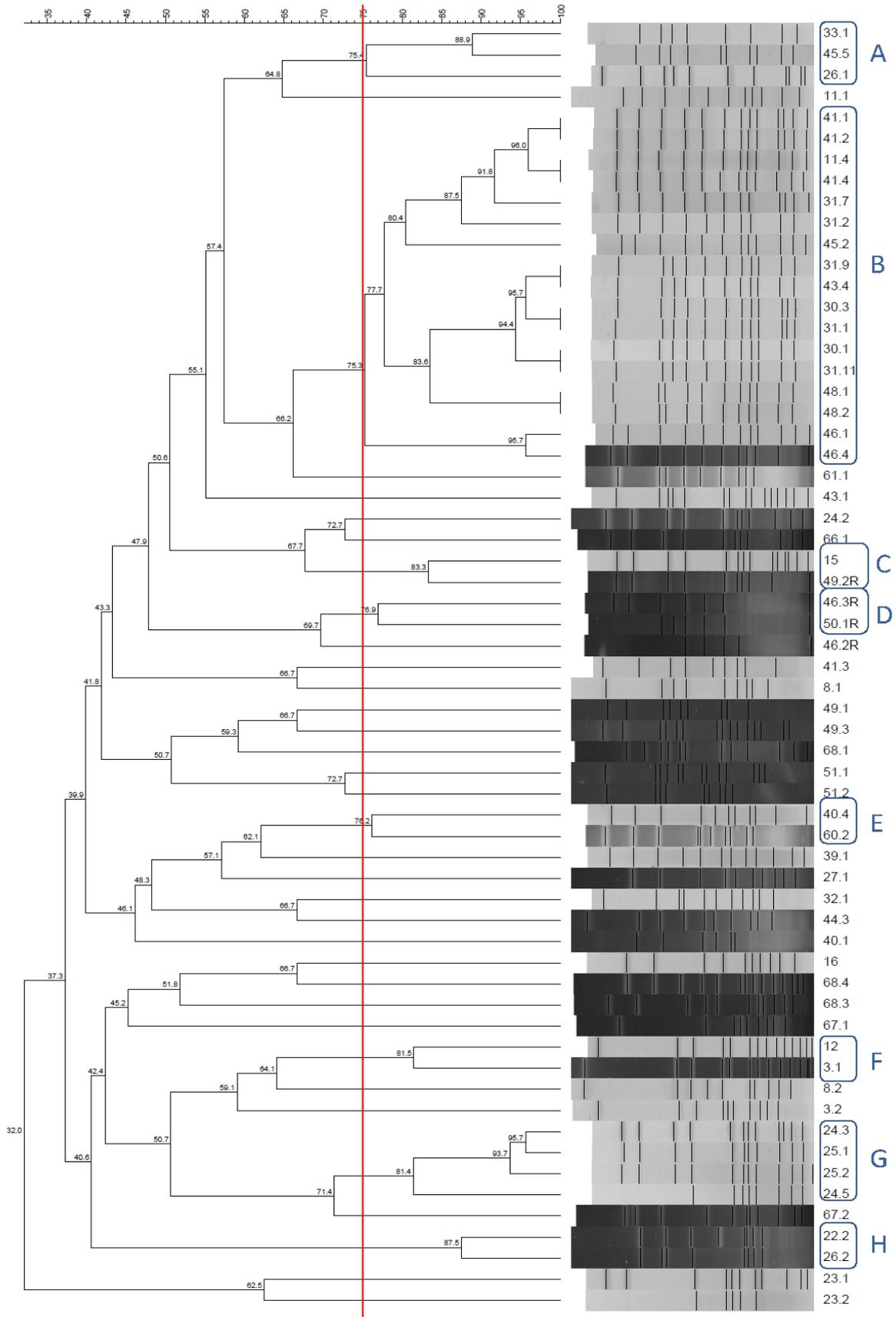


Figura II.5. Dendrograma resultado de la realización de la técnica PFGE sobre las cepas de *S. aureus* aisladas de leche y explotaciones caprinas.

---

## 5.- Formación de biofilm.

El ensayo de formación de biofilm se repitió hasta en 6 ocasiones en experimentos independientes, sin que se pudiesen obtener resultados repetitivos, ni siquiera cuando se emplearon cepas positivas para el gen *icaA*, por lo que los datos obtenidos en este ensayo no contribuyeron a la caracterización de las cepas dada la escasa fiabilidad de los resultados observados.

## DISCUSIÓN.

Para el control de las infecciones e intoxicaciones causadas por microorganismos la tipificación molecular de los mismos se ha convertido en esencial. Estas técnicas moleculares son eficaces en el seguimiento de la propagación de infecciones nosocomiales y de enfermedades de origen alimentario, y muy útiles para la planificación de las actividades del programa de control de la infección.

Partiendo de las supuestas cepas de *S. aureus* aisladas fenotípicamente a partir de muestras de leche de cabra procedentes de tanques, se llevó a cabo una caracterización de las mismas comenzando con la detección del gen de la coagulasa, característico de este microorganismo y que permite diferenciarlo de otras especies del género *Staphylococcus*. El resultado de la PCR y posterior revelado en gel de agarosa permitió diferenciar 3 tamaños de banda distintos, y clasificar las cepas en 3 grupos: grupo 1 (840 pb), grupo 2 (760 pb) y grupo 3 (610 pb), siendo el polimorfismo más frecuente el que presenta un tamaño de 840 pb para el gen de la coagulasa (37 %, 53 de 144 cepas que presentaron banda). Este resultado discrepa con lo obtenido por Scherrer et al. (2004), quienes detectaron 5 tamaños de banda distintos (500, 580, 660, 740 y 820 pb), y observaron que los polimorfismos más frecuentes en el caso de cepas de *S. aureus* aisladas de la leche de cabra son 660 pb (35,5 %) y 740 pb (25,6 %). Sin embargo, coinciden con los tamaños de banda obtenidos por Linage et al. (2012) en cepas aisladas de leche de oveja; estos autores detectaron que el tamaño más frecuente se correspondía con 840 pb (41,18 % de las cepas), seguido de 760 pb (30,72 %), 680 pb (24,83 %) y 600 pb (0,65 %). En un estudio clínico realizado en Japón

en el que se investigaron cepas tanto resistentes como sensibles a la meticilina aisladas de pacientes, los tamaños de banda que se obtuvieron fueron 560, 650, 730, 800, 930 pb, siendo el patrón más frecuente 800 pb (65 %) (Nada et al., 1996). Hookey et al. (1998) redujeron el número de patrones detectados en muestras clínicas a 4, con tamaños de banda correspondientes a 547, 603, 660 y 875 pb. Numerosos estudios han analizado la variabilidad en el tamaño de este gen para *S. aureus* aislado tanto de humanos como de vaca y pequeños rumiantes, obteniéndose diferentes patrones debido a un polimorfismo en la región 3' del gen. Esta región contiene una serie de 81 pb repetidas en tándem que es lo que origina las diferencias en el tamaño observadas entre las distintas cepas (Goh et al., 1992).

La diferencia entre *S. aureus* y las especies coagulasa negativas, es fundamental ya que *Staphylococcus aureus* supone un riesgo sanitario de máxima importancia. La identificación fenotípica de los estafilococos se basa en la morfología de las colonias, las características en cultivo y bioquímicas y el examen microscópico. Sin embargo, la detección de la coagulasa es el criterio más usado en todo el mundo para la diferenciación entre las especies (Bannerman et al., 2006). La capacidad de *Staphylococcus aureus* para producir coagulasa, una enzima capaz de coagular el plasma mediante la formación de un coágulo de fibrina a partir de fibrinógeno, fue comunicada por primera vez a principios del siglo XX (Loeb, 1903). Desde entonces, muchos investigadores han intentado correlacionar la producción de coagulasa con la patogenicidad de los estafilococos, aunque la experiencia más reciente ha demostrado que la capacidad de un estafilococo para producir coagulasa no puede utilizarse como indicador constante fiable de su poder patógeno (Valle et al., 1990; Vernozy-Rozand et al., 1996). La detección del gen de la coagulasa mediante PCR permitió determinar entre las cepas aisladas cuales poseían dicho gen, pero bien es sabido que poseer el gen no siempre significa que sean capaces de expresarlo, por ello se realizó el test de la coagulasa en tubo, prueba mediante la cual se pudo comprobar los distintos niveles de coagulación que presenta *S. aureus*. La mayoría de nuestras cepas mostraron la máxima capacidad de coagulación en poco tiempo, apenas 4 horas, lo que indica que, al menos en condiciones de laboratorio, no hay inhibición de la expresión de esta enzima.

---

Desde el punto de vista de las enfermedades de transmisión alimentaria, el aspecto más importante es la producción de enterotoxinas, ya que son resistentes a los diversos tratamientos térmicos que se pudieran aplicar a los alimentos. De sobra es sabido que la pasteurización que se aplica a la leche inactiva los microorganismos no esporulados pero no tiene ningún efecto sobre las enterotoxinas (Le Loir et al., 2003). En el caso de nuestras cepas de *S. aureus* aisladas de muestras de leche de cabra, la detección de los genes que codifican para tres tipos de toxinas estafilocócicas (SB (0,61 %), SA (2,44 %) y SD (21,95 %)) nos pone en alerta porque, aunque no se comprobó directamente la presencia de las enterotoxinas en la leche, éstas podrían estar presentes y llegar a la cadena alimentaria causando problemas como los originados por un brote en Barcelona, en el año 2011 que afectó a 42 personas, de las cuales 20 requirieron hospitalización, tras la ingesta de alimentos contaminados con enterotoxinas SA y SD (Solano et al., 2013). Llama la atención que en nuestras muestras de leche de cabra no se haya detectado ninguna cepa productora de la enterotoxina SC, la más común de entre las enterotoxinas clásicas (SEA, SEB, SEC, SED y SEE) detectada por la mayoría de los autores en leche de cabra y de pequeños rumiantes (Jørgensen et al., 2005a; Jørgensen et al., 2005b; Lyra et al., 2013; Scherrer et al., 2004). Algunos autores también han detectado mediante PCR la enterotoxina SA en leche de tanque de explotaciones caprinas (Scherrer et al., 2004), aunque ésta parece ser más frecuente en leche de vaca y en muestras humanas (Lyra et al., 2013; Rall et al., 2008; Rall et al., 2010). Un estudio comparativo de los estafilococos de las cabras y de las vacas de la misma región demostró que las enterotoxinas más comunes eran la SD (65,5 %) y la SA (51,7 %) en vacas, mientras que para cabra la más frecuente era la C (97,3 %) (Lyra et al., 2013), aunque otros estudios apuntan una frecuencia superior al 25 % de las enterotoxinas “nuevas” (SG, SI y SJ) en cabra (Scherrer et al., 2004). Jørgensen et al. (2005a) y McLauchlin et al. (2000) únicamente detectaron la enterotoxina SA en muestras de leche de cabra mediante detección directa de la toxina en la leche empleando el test rápido de aglutinación de látex (SET-RPLA), por lo que consideraron que podrían existir variaciones en la secuencia del gen que impidan su detección debido a las estrictas condiciones de la PCR. Este resultado sugiere la posibilidad de que se produzcan falsos negativos cuando se tratan de detectar las enterotoxinas mediante PCR, ya sea debido a las condiciones de la técnica o a

variaciones en la secuencia de los genes que codifican las enterotoxinas (Jørgensen et al., 2005a).

Para evaluar la posible clonalidad de las cepas que sugiere la prueba de la coagulasa junto con el análisis de la banda obtenida tras amplificar dicho gen, se realizó un análisis del patrón de restricción del producto amplificado en la PCR del gen *coa* (RFLP). Mediante esta técnica y el empleo de la enzima de restricción *HhaI* se obtuvieron 11 patrones de banda distintos. El número de fragmentos generado en cada patrón varía entre 2 y 5 bandas con tamaños entre 60 y 500 pb. Resultados similares obtuvieron Hookey et al. (1998) empleando un isoesquizómero de la enzima (*CfoI*). Estos autores identificaron 10 patrones distintos que contenían entre 2 y 5 bandas, y con tamaños entre 60 y 400 pb, al igual que en nuestro caso. La mayoría de los estudios que emplean enzimas de restricción con la misma secuencia de reconocimiento que la empleada por nosotros para analizar el patrón de restricción del gen de la coagulasa se han centrado en analizar la relación de las cepas MRSA, por lo cual no hay prácticamente estudios que nos permitan comparar nuestros resultados con los de otros autores ya que ninguna de nuestras cepas resultó poseer el gen de resistencia a la meticilina. Algunos autores han analizado mediante esta técnica distintas cepas aisladas de distintos orígenes, vacas, pequeños rumiantes e incluso alimentos, pero empleando otras enzimas (principalmente *AclI*) que originan patrones diferentes por lo que no son comparables con nuestros resultados. Aun así, la mayoría de los estudios concluyen que esta metodología por sí sola no es suficientemente discriminatoria para caracterizar los aislados, pero que en combinación con otra técnica molecular como es el PFGE, puede resultar muy útil para diferenciar entre las distintas cepas (Vautor et al., 2005).

La aplicación del PFGE, nos permitió clasificar las 61 cepas aisladas de muestras de tanque de leche en ocho *clusters* y 27 perfiles únicos con un 75 % de similitud. Esta técnica que ha sido considerada la técnica estrella para la tipificación molecular de *S. aureus* de diferentes orígenes dada su elevada capacidad discriminatoria y su reproducibilidad, y que se ha comprobado que también es muy útil para la identificación y caracterización de las cepas de *S. aureus* aisladas de alimentos, nos permitió ver que un *cluster* más numeroso (B) agrupa a la mayoría de las cepas

---

estudiadas. Sin embargo, existe mucha diversidad entre las cepas como muestran los numerosos perfiles de bandas únicos que se obtienen. Esta diversidad entre las cepas de *S. aureus* puede deberse a que las poblaciones donde se ubicaban las granjas se encuentran bastante distantes y no es frecuente el intercambio de cabezas de ganado entre ellas. No ocurre lo mismo en el caso de ganado ovino y vacuno, dónde diversos estudios han encontrado también gran diversidad, pero han detectado la presencia de determinados clones comunes en muchas de las subpoblaciones estudiadas (Alves et al., 2009; Mørk et al., 2007; Peles et al., 2007; Sabour et al., 2004; Vautor et al., 2003; Vautor et al., 2005).

En resumen, y teniendo en cuenta todos los datos de la caracterización de estas cepas, podemos concluir que, a pesar de no haber grandes diferencias fenotípicas, existe una gran diversidad genotípica entre ellas, posiblemente debida a la distancia entre las explotaciones. Además, la presencia de algunas cepas potencialmente productoras de enterotoxinas podría suponer un riesgo para la población si éstas llegaran a la cadena alimentaria y se dieran circunstancias, como la interrupción de la cadena del frío, que permitieran su multiplicación hasta niveles peligrosos ( $10^6$  ufc/g o ml).

## **BIBLIOGRAFÍA.**

- Alves, P., McCulloch, J., Even, S., Le Maréchal, C., Thierry, A., Grosset, N., Azevedo, V., Rosa, C., Vautor, E., Le Loir, Y., 2009. "Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from small and large ruminants reveals a host rather than tissue specificity". *Veterinary Microbiology*. 137, 190-195.
- Arciola, C.R., Baldassarri, L., Montanaro, L., 2001. "Presence of *icaA* and *icaD* genes and slime production in a collection of Staphylococcal strains from catheter-associated infections". *Journal of Clinical Microbiology*. 39, 2151-2156.
- Bannerman, T.L., Peacock, S., Murray, P., Baron, E., Jørgensen, H., Landry, M., Pfaller, M., 2006. "*Staphylococcus*, *Micrococcus*, and other catalase-positive cocci". En

- P. R. Murray; E. J. Baron; J. H. Jorgensen; M. L. Landry; M. A. Pfaller (Eds.), "Manual of Clinical Microbiology". Washinton, DC, EE.UU., Volume 1, 390-411.
- CDC, P., 2012. "Oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* on PulseNet (OPN): laboratory protocol for molecular typing of *S.aureus* by pulsed field gel electrophoresis (PFGE)". [http://www.cdc.gov/mrsa/pdf/ar\\_mras\\_PFGE\\_s\\_aureus.pdf](http://www.cdc.gov/mrsa/pdf/ar_mras_PFGE_s_aureus.pdf).
- Chiang, Y., Liao, W., Fan, C., Pai, W., Chiou, C., Tsen, H., 2008. "PCR detection of Staphylococcal enterotoxins (SEs) N, O, P, Q, R, U, and survey of SE types in *Staphylococcus aureus* isolates from food-poisoning cases in Taiwan". International Journal of Food Microbiology. 121, 66-73.
- Contreras, A., Sierra, D., Sánchez, A., Corrales, J., Marco, J., Paape, M., Gonzalo, C., 2007. "Mastitis in small ruminants". Small Ruminant Research. 68, 145-153.
- Cucarella, C., Solano, C., Valle, J., Amorena, B., Lasa, Í, Penadés, J.R., 2001. "Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation". Journal of Bacteriology. 183, 2888-2896.
- Dinges, M.M., Orwin, P.M., Schlievert, P.M., 2000. "Exotoxins of *Staphylococcus aureus*". Clinical Microbiology Reviews. 13, 16-34.
- Enright M. C., 2008. "*Staphylococcus*. Molecular genetics". Caister Academic Press, Norfolk, Reino Unido.
- Forbes, B.A., Sahm, D.F., Weissfeld, A.S., 1998. "Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology". Mosby Inc., London, Reino Unido.
- Goering, R.V., Duensing, T.D.,1990. Rapid field inversion gel electrophoresis in combination with an rRNA gene probe in the epidemiological evaluation of staphylococci. Journal of clinical microbiology 28, 426-429.
- Goering, R.V., 2004. "Pulsed-Field Gel Electrophoresis". En D.H. Persing, F.C. Tenover, J. Versalovic, Y. Tang, E.R. Unger, D.A. Relman, T.J. White (Eds.), "Molecular Microbiology. Diagnostic Principles and Practice". ASM Press, Washington DC., EE.UU., pp. 185-196.

- 
- Goh, S.H., Byrne, S.K., Zhang, J.L., Chow, A.W., 1992. "Molecular typing of *Staphylococcus aureus* on the basis of coagulase gene polymorphisms". *Journal of Clinical Microbiology*. 30, 1642-1645.
- Holmberg, S.D., Blake, P.A., 1984. "Staphylococcal food poisoning in the United States". *Journal of the American Medical Association*. 251, 487-489.
- Hookey, J.V., Richardson, J.F., Cookson, B.D., 1998. "Molecular typing of *Staphylococcus aureus* based on PCR restriction fragment length polymorphism and DNA sequence analysis of the coagulase gene". *Journal of Clinical Microbiology*. 36, 1083-9.
- Jørgensen, H., Mørk, T., Høgåsen, H., Rørvik, L., 2005a. "Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in bulk milk in Norway". *Journal of Applied Microbiology*. 99, 158-166.
- Jørgensen, H.J., Mørk, T., Caugant, D.A., Kearns, A., Rørvik, L.M., 2005b. "Genetic variation among *Staphylococcus aureus* strains from Norwegian bulk milk". *Applied and Environmental Microbiology*. 71, 8352-8361.
- King, M.D., Humphrey, B.J., Wang, Y.F., Kourbatova, E.V., Ray, S.M., Blumberg, H.M., 2006. "Emergence of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA 300 clone as the predominant cause of skin and soft-tissue infections". *Annals of Internal Medicine*. 144, 309-317.
- Lancette, G.A., Bennett, R.W., 2001. *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal Enterotoxins. En F. Pouch Downes, K. Ito (Eds.), "Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods". American Public Health Association, Washinton, DC, EE.UU., pp. 387-403.
- Le Loir, Y., Baron, F., Gautier, M., 2003. "*Staphylococcus aureus* and food poisoning". *Genetics and Molecular Research*. 2, 63-76.
- Linage, B., Rodríguez-Calleja, J., Otero, A., García-López, M., Santos, J., 2012. "Characterization of coagulase-positive staphylococci isolated from tank and silo ewe milk". *Journal of Dairy Science*. 95, 1639-1644.

- Loeb, L., 1903. "The Influence of certain Bacteria on the Coagulation of the Blood". *Journal of Medical Research*. 10, 407-419.
- Lyra, D.G., Sousa, F.G., Borges, M.F., Givisiez, P.E., Queiroga, R.C., Souza, E.L., Gebreyes, W.A., Oliveira, C.J., 2013. "Enterotoxin-Encoding Genes in *Staphylococcus* spp. from Bulk Goat Milk". *Foodborne Pathogens and Disease*. 10, 126-130.
- McLauchlin, J., Narayanan, G., Mithani, V., O'Neill, G., 2000. "The detection of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin genes in *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction". *Journal of Food Protection*. 63, 479-488.
- Mørk, T., Waage, S., Tollersrud, T., Kvitle, B., Sviland, S., 2007. "Clinical mastitis in ewes; bacteriology, epidemiology and clinical". *Acta Veterinaria Scandinavica*. 49, 23.
- Moroni P., Pisoni G., Cremonesi P., Castiglione B., 2011. "*Staphylococcus*". En Dongyou Liu (Ed.), "Molecular detection of human bacterial pathogens". CRC Press, Taylor and Francis Group, pp. 307.
- Mossel, D.A.A., Moreno. B., Struijk, D.B., 2003. *Microbiología de los Alimentos. Fundamentos ecológicos para garantizar y comprobar la integridad (inocuidad y calidad) microbiológica de los alimentos*. Acribia, Zaragoza.
- Murray P., Rosenthal K., Pfaller M., 2009. *Staphylococcus* y cocos gram positivos relacionados. En Murray P. (Ed.) "Microbiología Médica", Elsevier-Mosby, pp. 209 - 224.
- Nada, T., Ichiyama, S., Osada, Y., Ohta, M., Shimokata, K., Kato, N., Nakashima, N., 1996. "Comparison of DNA fingerprinting by PFGE and PCR-RFLP of the coagulase gene to distinguish MRSA isolates". *Journal of Hospital Infection*. 32, 305-317.
- Peles, F., Wagner, M., Varga, L., Hein, I., Rieck, P., Gutser, K., Keresztúri, P., Kardos, G., Turcsányi, I., Béri, B., 2007. "Characterization of *Staphylococcus aureus* strains

- 
- isolated from bovine milk in Hungary". *International Journal of Food Microbiology*. 118, 186-193.
- Rall, V., Sforcin, J., Augustini, V., Watanabe, M., Fernandes Jr, A., Rall, R., Silva, M., Araújo Jr, J., 2010. "Detection of enterotoxin genes of *Staphylococcus* sp. isolated from nasal cavities and hands of food handlers". *Brazilian Journal of Microbiology*. 41, 59-65.
- Rall, V., Vieira, F., Rall, R., Vieitis, R., Fernandes Jr, A., Candeias, J., Cardoso, K., Araújo Jr, J., 2008. "PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw and pasteurized milk". *Veterinary Microbiology*. 132, 408-413.
- Rasmussen, H.B., 2012. "Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of PCR-Amplified Fragments (PCR-RFLP) and Gel Electrophoresis - Valuable Tool for Genotyping and Genetic Fingerprinting" En Magdeldin S. (Ed.) "Gel Electrophoresis - Principles and Basics". (<http://www.intechopen.com/books/gel-electrophoresis-principles-and-basics>)
- Ribot, E.M., Fair, M., Gautom, R., Cameron, D., Hunter, S., Swaminathan, B., Barrett, T.J., 2006. "Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet". *Foodborne Pathogens and Disease*. 3, 59-67.
- Rosec, J.P., Gigaud, O., 2002. "Staphylococcal enterotoxin genes of classical and new types detected by PCR in France". *International Journal of Food Microbiology*. 77, 61-70.
- Sabour, P.M., Gill, J.J., Lepp, D., Pacan, J.C., Ahmed, R., Dingwell, R., Leslie, K., 2004. "Molecular typing and distribution of *Staphylococcus aureus* isolates in Eastern Canadian dairy herds". *Journal of Clinical Microbiology*. 42, 3449-3455.
- Smyth, R.W., Kahlmeter, G., Olsson Liljequist, B., Hoffman, B., 2001. "Methods for identifying methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*". *Journal of Hospital Infection*. 48, 103-107.

- Scherrer, D., Corti, S., Muehlherr, J., Zweifel, C., Stephan, R., 2004. "Phenotypic and genotypic characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from raw bulk-tank milk samples of goats and sheep". *Veterinary Microbiology*. 101, 101-107.
- Solano, R., Lafuente, S., Sabate, S., Tortajada, C., García de Olalla, P., Hernando, A.V., Caylà, J., 2013. "Enterotoxin production by *Staphylococcus aureus*: An outbreak at a Barcelona sports club in July 2011". *Food Control*. 33, 114-118.
- Tirado, C., Schmidt, K., 2001. "WHO Surveillance Programme for Control of Foodborne Infections and Intoxications: Preliminary Results and Trends Across Greater Europe". *Journal of Infection*. 43, 80-84.
- Valle, J., Gomez-Lucia, E., Piriz, S., Goyache, J., Orden, J.A., Vadillo, S., 1990. "Enterotoxin production by staphylococci isolated from healthy goats". *Applied and Environmental Microbiology*. 56, 1323-1326.
- Vasudevan, P., Nair, M.K.M., Annamalai, T., Venkitanarayanan, K.S., 2003. "Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation". *Veterinary Microbiology*. 92, 179-185.
- Vautor, E., Abadie, G., Guibert, J., Huard, C., Pepin, M., 2003. "Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from various sites on farms with dairy sheep using pulsed-field gel electrophoresis". *Veterinary Microbiology*. 96, 69-79.
- Vautor, E., Jay, C., Chevalier, N., Visomblin, N., Vernet, G., Pepin, M., 2005. "Characterization of 26 isolates of *Staphylococcus aureus*, predominantly from dairy sheep, using four different techniques of molecular epidemiology". *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 17, 363-368.
- Vernozy-Rozand, C., Mazuy, C., Prevost, G., Lapeyre, C., Bes, M., Brun, Y., Fleurette, J., 1996. "Enterotoxin production by coagulase-negative staphylococci isolated from goats' milk and cheese" *International Journal of Food Microbiology*. 30, 271-280.

---

Zetola, N., Francis, J.S., Nuermberger, E.L., Bishai, W.R., 2005. "Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an emerging threat". *The Lancet Infectious Diseases*. 5, 275-286.



**CAPÍTULO III. CARACTERIZACIÓN DE *E. coli*.**



## INTRODUCCIÓN.

### Biología de *E. coli*.

*Escherichia coli* es un bacilo con forma de bastón que mide aproximadamente 2  $\mu\text{m}$  de largo y 0,5  $\mu\text{m}$  de diámetro. Perteneciente a la familia Enterobacteriaceae, género *Escherichia*. Es una bacteria Gram-negativa, anaerobio facultativa, y generalmente móvil gracias a la presencia de flagelos peritricos. No forma esporas. (Garrity et al., 2005).

*E. coli* supone la bacteria predominante en la microbiota intestinal de los humanos y otros vertebrados, colonizando el tracto gastrointestinal ya desde las primeras horas de vida de los nuevos individuos, y se mantiene en él durante toda la vida debido a la relación mutualista que mantienen, en la cual se proporcionan nutrientes y regulación inmune frente a otros patógenos (Nataro & Kaper, 1998). Pero no siempre esta relación mutualista se mantiene. En individuos con una salud debilitada o inmunodeprimidos, o con enfermedades que destruyen las barreras gastrointestinales, hasta las cepas no patógenas de *E. coli* pueden causar infecciones. Pero los mayores problemas los causan algunos clones de *E. coli* que han adquirido factores de virulencia específicos, lo que les ha permitido adaptarse a nuevos nichos y producir un amplio espectro de enfermedades en humanos y animales, incluso en individuos inicialmente sanos (Elizaquível et al., 2011).

Utilizando el sistema de clasificación antigénica propuesto por Kauffman, en la actualidad se reconocen en *E. coli* del orden de 180 antígenos somáticos (O1 a O185) y 56 antígenos flagelares (H1 a H56) y, aunque las posibles combinaciones O:H son numerosas, tan sólo algunas son frecuentes entre las cepas patógenas. La determinación de estos antígenos se realiza por técnicas de aglutinación usando antisueros absorbidos para evitar las reacciones cruzadas (AESAN, 2012).

Las cepas patógenas de *E. coli* pueden dar lugar a enfermedades tanto intestinales como extraintestinales, ocasionando principalmente tres tipos de síntomas clínicos: infecciones del tracto urinario (UTI), sepsis o meningitis neonatal y enfermedades entéricas que en algunos casos pueden derivar en Síndrome Urémico-

Hemolítico (SUH). Las bacterias causantes de enfermedades entéricas se adquieren por vía oral y eso hace que tengan gran interés desde el punto de vista de la seguridad alimentaria. El mecanismo de infección básico que sigue esta bacteria es el de la gran mayoría de patógenos de las mucosas, colonización de la mucosa, evasión de las defensas del hospedador, multiplicación y daño en el individuo (Nataro & Kaper, 1998). Se han descrito 6 tipos patógenos entéricos o patotipos basados en el mecanismo infección: *E. coli* enteropatógeno (EPEC), *E. coli* enterohemorrágico (EHEC), *E. coli* enterotoxigénico (ETEC), *E. coli* enteroagregativo (EAEC), *E. coli* enteroinvasivo (EIEC) y *E. coli* con adherencia difusa. (DAEC) (Elizaquível et al., 2011; Kaper et al., 2004).

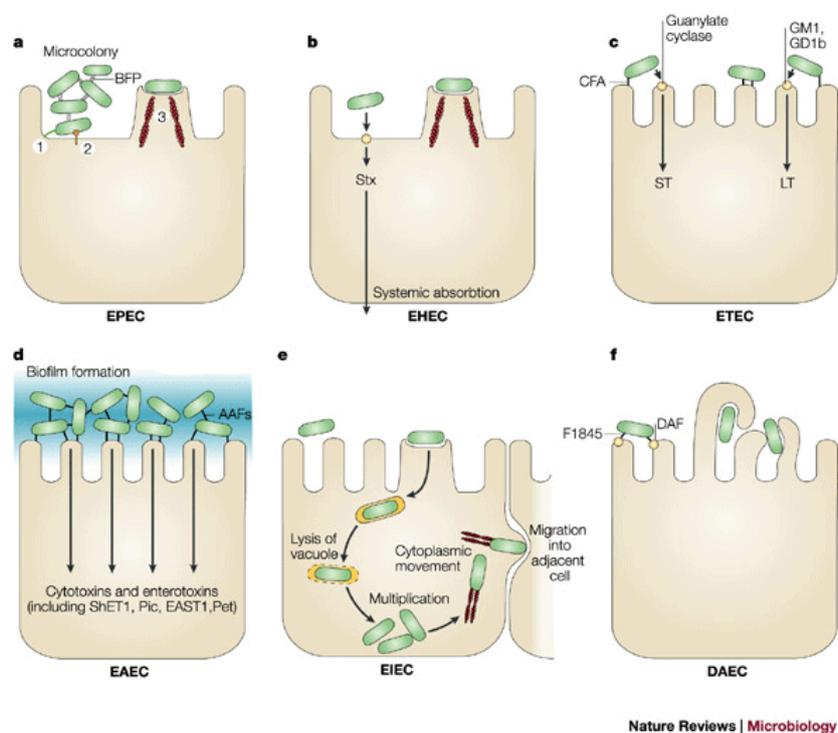


Figura III.1. Esquema patogénico de cepas de *E. coli* diarregénicas (Kaper et al., 2004).

- **EPEC:**

El patotipo EPEC se define como cepas productoras de diarrea que originan lesiones intestinales de adhesión y borrado (A/E) pero que no poseen los genes que codifican para las toxinas Shiga (verotoxinas). Se multiplican en el intestino delgado provocando diarrea acuosa que puede contener mucus pero no sangre, y también son frecuentes otros síntomas como vómitos, fiebre, malestar y deshidratación. Los

síntomas suelen durar unos días y luego remitir, pero también se han descrito casos crónicos (Elizaquível et al., 2011; Kaper et al., 2004).

Las lesiones de adhesión-borrado (A/E) se caracterizan por la destrucción de las microvellosidades, adherencia íntima de la bacteria al epitelio intestinal, formación de un pedestal y agregación de actina y otros elementos del citoesqueleto a los lugares de adherencia de la bacteria (Trabulsi et al., 2002).

Los genes responsables de las lesiones de adhesión-borrado se encuentran en una isla de patogenicidad de 35 kb denominada *locus of enterocyte effacement* (LEE). En esta isla de patogenicidad se hallan los genes que codifican para la proteína externa de membrana denominada intimina (*eae*), los genes implicados en el sistema de secreción tipo III, los genes *esp* (*E. coli* secreted proteins A, B y D), y el gen que codifica para el receptor translocador de intimina Tir (*translocated intimin receptor*) (Kaper et al., 2004; Trabulsi et al., 2002).

Algunas cepas de EPEC presentan otros factores de virulencia que no están codificados por la isla de patogenicidad LEE, sino que se encuentran en un plásmido de 70 – 100 pb, el plásmido *EPEC adherence factor* (EAF). La presencia o ausencia de este plásmido nos permite diferenciar dos tipos de cepas EPEC. Las denominadas EPEC típicas (tEPEC) poseen este plásmido EAF donde se localiza el operón *bfp* que codifica para el *Bundle Forming Pilus* (BFP), un pilus de adherencia tipo IV. Las EPEC atípicas (aEPEC), no poseen el plásmido EAF, aunque poseen otros factores de virulencia ausentes en las tEPEC. Las tEPEC son una de las principales causas de diarrea infantil en países en desarrollo, mientras que las aEPEC han sido causa de grandes brotes de enfermedades diarreicas en países desarrollados, tanto en niños como en adultos, y parecen estar más estrechamente relacionados con STEC (Elizaquível et al., 2011; Kaper et al., 2004; Trabulsi et al., 2002).

Las cepas aEPEC poseen reservorios tanto humanos como animales y actualmente están adquiriendo importancia como patógeno emergente debido a su transmisión a través de los alimentos. En el caso de las cepas tEPEC normalmente aparecen asociadas a contaminación fecal humana y suponen una de las principales causas de diarrea en niños en países en desarrollo, mientras que en países

---

desarrollados su frecuencia ha disminuido (aunque siguen siendo una causa importante de diarrea) (Kaper et al., 2004; Otero et al., 2013).

- **EHEC:**

Este patotipo comparte con EPEC la habilidad de producir lesiones de adhesión-borrado gracias a que ambas comparten la isla de patogenicidad LEE, pero se diferencian en la capacidad que tiene EHEC de producir toxinas denominadas toxinas Shiga (Stx -debido a la similitud demostrada con las toxinas de *Shigella dysenteriae*-) o verotoxinas (VT -por el efecto citopático que producen en las células Vero-). Existen dos familias de toxinas Shiga, Stx1 y Stx2, que presentan un 55 % de aminoácidos homólogos (Elizaquível et al., 2011; Kaper et al., 2004).

Los síntomas que puede ocasionar EHEC son diarrea no hemorrágica, colitis hemorrágica (CH), síndrome urémico hemolítico (SUH) y púrpura trombocitopénica trombótica (PTT). Una vez que la bacteria ha colonizado el intestino grueso, produce las toxinas Shiga que actúan de forma local, induciendo apoptosis en las células epiteliales del intestino y ocasionando con ello colitis hemorrágica, necrosis y ulceración intestinal. Además estas toxinas pueden viajar a través del torrente sanguíneo hasta los riñones, donde dañan las células endoteliales del riñón y obstruyen la microvascularización a través de una toxicidad directa y una inducción de producción local de citoquinas y quimioquinas, dando lugar a inflamación renal. Este daño renal puede evolucionar al SUH, síndrome caracterizado por una triada de anemia hemolítica, trombocitopenia y fallo renal. Los niños menores de 5 años y los ancianos son los principales afectados por este síndrome (Elizaquível et al., 2011; Kaper et al., 2004).

Aunque existen más de 200 serotipos de cepas de *E. coli* capaces de producir toxinas Shiga, la mayor parte de estos serotipos no poseen la isla de patogenicidad LEE y generalmente no se asocian con la enfermedad en humanos, pero se ha demostrado que algunas cepas carentes de dicha isla presentan otros factores de virulencia adicionales (factores de adherencia). La isla de patogenicidad LEE y la producción de Stxs permite diferenciar entre cepas EPEC (*eae+*) y STEC (*stxs+*). Estas últimas pueden ser además *eae+*, siendo las más patógenas (EHEC) (Kaper et al., 2004).

Más de 50 serotipos se han asociado con colitis hemorrágica o SUH en humanos. Karmali et al. (2003) han propuesto clasificar los serotipos de las cepas STEC en cinco seropatotipos, atendiendo a su incidencia y asociación con casos de SUH y brotes. El seropatotipo A incluye cepas altamente virulentas de los serotipos O157:H7 (no fermentadoras de sorbitol) y O157:H- (inmóviles y fermentadoras de sorbitol) causantes de numerosos brotes y frecuentemente asociadas con SUH. Para las cepas de este seropatotipo las dosis infectivas se sitúan entre 10 y 100 células. El seropatotipo B incluye serotipos que han causado brotes ocasionales y son relativamente comunes en casos SUH y CH (O26:H11, O103:H2, O111:H8, O111:H-, O121:H19, O145:H-). El seropatotipo C incluye serotipos no responsables de brotes pero que se han aislado de pacientes con SUH y CH (O5:H-, O91:H21, O104:H21, O113:H21, O121:H-, O165:H25 y otros). El seropatotipo D incluye serotipos que nunca se han asociado con SUH, pero que sí se han aislados de pacientes con patologías menos graves (diarrea y CH) (O7:H4, O69:H11, O103:H25, O113:H4, O117:H7, O119:H25, O132:H-, O146:H21, O171:H2, O172:H-, O174:H8 y otros). Por último, el seropatotipo E incluye muchos serotipos aislados de animales, alimentos y del medioambiente no implicados nunca con casos clínicos/enfermedad en humanos. Es por lo tanto muy importante determinar el serotipo de la cepa STEC para poder evaluar el riesgo patogénico potencial de la misma (AESAN, 2012; Blanco, 2012).

La mayoría de los casos son debidos al serotipo O157:H7, pero también otros serotipos como son O26:H11, O103:H2, O111:H- y O113:H21 se han asociado con procesos graves en humanos (Nataro & Kaper, 1998). En Estados Unidos, Reino Unido y Japón, el serotipo O157:H7 es el patógeno más importante de este patotipo, pero en otros países destacan otros serotipos (particularmente los pertenecientes a los serogrupos O26 y O111) (Kaper et al., 2004).

El principal reservorio es el tracto intestinal de los bóvidos, pero se ha demostrado que las cepas STEC también se encuentra en el tracto intestinal de otros animales domésticos como son ovino, caprino, porcino, gatos y perros. Las formas de transmisión son a través de alimentos o agua contaminados, y persona a persona o por contacto con animales infectados. La baja dosis infectiva de esta bacteria (la ingesta de menos de 100 células basta para que se produzca la enfermedad) junto con su

---

resistencia a la acidez la convierten en un importante patógeno alimentario (Elizaquível et al., 2011; Kaper et al., 2004; Paton & Paton, 1998).

- **ETEC:**

Se caracteriza porque sus cepas patógenas secretan al menos una de las dos enterotoxinas que componen su mecanismo de virulencia, la enterotoxina termolábil (heat-labile enterotoxin –LT-) relacionada con la toxina de *Vibrio cholerae*, y la enterotoxina termoestable (heat-stable enterotoxin –ST-), ambas se secretan una vez que la bacteria se ha unido en la parte final del intestino delgado. La toxina LT puede ser de dos tipos, LT-I o LT-II, dando lugar a dos serogrupos distintos. LT-I está asociada a cepas patógenas capaces de infectar tanto humanos como animales y LT-II se ha encontrado principalmente en animales y rara vez en humanos. Ambos tipos de toxina LT actúan activando una serie de enzimas que acaban produciendo una inversión del gradiente osmótico intestinal y la pérdida neta de agua en el intestino. De la toxina ST también existen dos tipos (STa y STb) que difieren tanto en estructura como en su mecanismo de acción. Las toxinas STa son muy similares a las producidas por otras bacterias patógenas gram-negativas y solo se han asociado con enfermedad en humanos y las toxinas STb están asociadas a enfermedad en animales (Elizaquível et al., 2011; Kaper et al., 2004).

El síntoma más característico es diarrea acuosa, tanto en el hombre como en los animales, que puede ser desde leve hasta grave, dando lugar a síntomas similares a los del cólera, produciendo deshidratación e incluso provocando la muerte en los casos más graves. En países en desarrollo es frecuente que este patotipo de lugar a diarrea en niños, y además es una de las principales causas de la diarrea del viajero (Elizaquível et al., 2011; Kaper et al., 2004).

- **EAEC:**

EAEC se define como un grupo de cepas de *E. coli* que no producen las toxinas LT o ST y que se adhieren a las células HEp-2 en un patrón conocido como enteroagregativo, en el que las bacterias se adhieren unas a otras en una configuración de “ladrillos apilados”. Este patotipo origina una diarrea acuosa que en ocasiones se

presenta acompañada de dolor abdominal pero sin fiebre. Tampoco ocurre una invasión del torrente sanguíneo. Frecuentemente son la causa de diarrea persistente en niños y adultos tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo (Elizaquível et al., 2011; Kaper et al., 2004). Su reservorio son únicamente los seres humanos (Blanco, 2012).

La infección por este patotipo parece comenzar con la colonización de la mucosa intestinal, principalmente en el colon, seguido de la secreción de enterotoxinas y citotoxinas. La adhesión de estas bacterias al epitelio intestinal se produce gracias a la expresión de estructuras fimbriales denominadas AAFs (*aggregative adherence fimbriae*), de las que existen al menos 4 variantes alélicas, además de otros factores de adherencia como una proteína denominada dispersina. Tras la adhesión, EAEC produce diferentes toxinas como Pic (*protein involved in intestinal colonization*), ShET1 (*Shigella enterotoxin 1*), EAST1 (*enteroaggregative E. coli ST*) y Pet (*plasmid-encoded toxin*) que son las responsables del acortamiento de las vellosidades, hemorragia, ulceración y necrosis que ocurre en este tipo de infección (Kaper et al., 2004).

En mayo de 2011, una cepa de *E. coli* enteroagregativa y productora de toxina Stx2a causó un importante brote en Alemania en el que se vieron afectadas 3842 personas, de las que 855 desarrollaron SUH y 53 fallecieron, además de otros casos detectados en otros 13 países de la Unión Europea, Estados Unidos y Canadá en pacientes que habían visitado Alemania. Casi simultáneamente se produjo otro brote menor en Francia, con 15 casos de diarrea sanguinolenta, de los cuales nueve progresaron a SUH. La cepa tan virulenta causante de estos brotes es atípica en muchos aspectos, la combinación de genes de virulencia de los dos patotipos (enteroagregativa y productora de toxinas Shiga) es poco frecuente. La cepa responsable pertenecía al serotipo O104:H4 que raramente se había aislado en pacientes humanos y nunca en animales ni en alimentos. Carece de la isla de patogenicidad LEE presente en las cepas STEC y es multirresistente. Por ello se cree que se trata de una nueva cepa de origen humano que ha emergido recientemente a partir de una cepa enteroagregativa del serotipo O104:H4 mediante la adquisición de

---

un fago portador del gen *stx2a* presente en las cepas STEC (Blanco, 2012; Frank et al., 2011).

- **EIEC:**

Este patotipo se encuentra muy relacionado tanto patogénica como bioquímica y genéticamente con *Shigella*, compartiendo los principales genes de virulencia de esta bacteria ya que éstos se localizan en un plásmido que comparten ambas bacterias (pWR100). Al igual que *Shigella*, EIEC produce colitis inflamatoria invasiva y disentería con presencia de mucus y sangre en las heces, fiebre y dolor abdominal intenso, aunque en la mayor parte de los casos únicamente da lugar a diarrea acuosa (Elizaquível et al., 2011; Kaper et al., 2004).

EIEC invade el epitelio intestinal, principalmente del intestino grueso, lisa la vacuola endocítica, se multiplica en el citoplasma celular y se mueve a través de este citoplasma hacia las células adyacentes. Además, aunque no llega al torrente sanguíneo, este patotipo invade la lámina propia donde es capaz de producir apoptosis en los macrófagos infectados (Kaper et al., 2004).

- **DAEC:**

DAEC puede ocasionar diarrea en niños menores de un año y se diferencia de otros *E. coli* diarreagénicos por su inconfundible fenotipo de adhesión a células Hep-2. Las cepas de DAEC inducen en los enterocitos un efecto citopático caracterizado por el desarrollo de largas extensiones celulares que envuelven a la bacteria adherida (Kaper et al., 2004).

## **Importancia de los alimentos en la transmisión de EPEC y STEC.**

- **EPEC:**

*E. coli* enteropatogénico (EPEC) es un grupo patógeno de *E. coli*, que produce diarreas en niños, sobre todo menores de 2 años y en países en vías de desarrollo, donde se considera el responsable de entre el 5 % y el 10 % de los casos de diarreas

pediátricas (Ochoa et al., 2008), y también en países desarrollados, donde algunos serotipos de cepas atípicas se consideran patógenos emergentes, que afectan tanto a niños como a adultos (Hernandes et al., 2009a; Trabulsi et al., 2002). Hay muy pocos trabajos que estudien la presencia de EPEC en muestras de alimentos y la incidencia en estas muestras es muy variable (Carneiro et al., 2006; Cortés et al., 2005; Díez et al., 2009; Otero et al., 2013).

- **EHEC:**

*E. coli* enterohemorrágico (EHEC) es capaz de producir colitis hemorrágica que puede complicarse con el síndrome urémico hemolítico, especialmente en niños y ancianos en los cuales puede ocasionar una considerable mortalidad. Por esto, junto por su capacidad de producir brotes epidémicos y por su transmisión a través de los alimentos, este microorganismo preocupa mucho a las autoridades sanitarias (Comisión Europea, 2005; Margall et al., 1997). Según datos del Departamento de Epidemiología del Instituto de Salud Carlos III (SIM, 2003), durante el periodo comprendido entre los años 1994 y 2003 se produjeron, en España, 6 brotes de STEC transmitidos por alimentos, y a pesar de que en los últimos años se ha aumentado el control sobre los alimentos que presentan un mayor riesgo, aún se siguen dando nuevos casos. De hecho, en España durante el año 2012 se notificaron 18 aislamientos de *E. coli* verotoxigénico, que afectaban a individuos en un rango de población que iba de los 8 meses a los 63 años, siendo mayoritarios los casos en menores de 8 años (61,11 %), pero estos datos podrían ser inferiores a los reales, ya que proporcionan esta información un número reducido de laboratorios ubicados en ciertas Comunidades Autónomas (SIM, 2014).

A nivel europeo, los datos recogidos por la EFSA y el ECDC en el informe anual sobre zoonosis, agentes zoonóticos y brotes de origen alimentario muestran que en el año 2012, se registraron en la Unión Europea un total de 5671 casos confirmados por *E. coli* verotoxigénico, lo que supone una disminución del 40 % respecto a los datos del año 2011, año en el que se produjo el brote antes citado, que ocurrió principalmente en Alemania y que fue originado por una cepa O104:H4. En los casos en los que se conocía el serogrupo la mayoría fueron debidos al serogrupo O157, seguido de los

---

serogrupos O26 y O91. Aún sin tener en cuenta los datos del año 2011, los datos registrados entre los años 2008 y 2012 indican una tendencia al alza de las infecciones en humanos causadas por STEC. En muestras de animales y alimentos, la mayoría de las que eran positivas contenían cepas *E. coli* verotoxigénicas y se obtuvieron de ganado vacuno y de su carne, pero la bacteria también se detectó en otras especies animales y diferentes alimentos (EFSA, 2014).

Otros estudios elaborados a partir de datos del Hospital Lucus Augusti de Lugo revelan que entre 1992 y 2011 se detectaron cepas de *E. coli* verotoxigénico en un 2,8 % de los coprocultivos examinados, correspondiendo un 0,4 % al serotipo O157:H7 y 1,8 % a serotipos STEC no-O157:H7, por lo tanto si se extrapolan los datos, en España se producirían cada año más de 500 casos de infección por STEC O157:H7 y más de 2000 casos causados por STEC no-O157. De las cepas no-O157:H7 detectadas en este periodo de tiempo el serotipo observado más frecuentemente fue el O26:H11, y no se detectó ninguna cepa perteneciente al serotipo O104:H4 implicado en los brotes de Alemania y Francia (AESAN, 2012).

## **Caracterización molecular.**

Como ya se comentó en el capítulo de *S. aureus*, las técnicas de tipificación molecular son muy útiles para realizar estudios ecológicos y epidemiológicos. A pesar de que en la actualidad ya existe una gran variedad, continúan surgiendo nuevas técnicas que mejoran o complementan los resultados obtenidos con las anteriores.

PFGE es una técnica muy empleada en la caracterización de numerosos microorganismos, incluido *E. coli*. Su utilización ha permitido realizar grandes avances en la investigación de las relaciones génicas entre las distintas cepas, y a pesar de que algunos la siguen considerando la “técnica estrella”, algunas cepas no son tipables con esta metodología debido a la degradación del ADN durante el proceso de preparación de las muestras. Por ello, una nueva técnica basada en la secuenciación de genes (MLST) está ayudando a solventar los problemas encontrados en la PFGE.

### **Tipificación Multilocus de Secuencias (MLST).**

La tipificación multilocus de secuencias (MLST), a pesar de ser una técnica relativamente novedosa en el campo de la biología molecular, es una técnica genética muy empleada para realizar clasificaciones taxonómicas de bacterias, hongos patógenos y parásitos. Se basa en el análisis de los pequeños cambios producidos en las secuencias de una serie de genes conservados (que generalmente codifican funciones metabólicas esenciales) de tamaño entre 450 y 500 pb para caracterizar las distintas cepas mediante sus perfiles alélicos únicos (denominados *sequence type* -ST-). Este sistema de tipificación es altamente discriminatorio y basta el análisis de pocos genes, generalmente siete, para obtener buenos resultados. Aunque esta técnica, al igual que la PFGE, también presenta algunas limitaciones, como es la necesidad de analizar varios loci para obtener una discriminación suficiente, con el coste que esto actualmente supone (Hanage et al., 2004).

Al igual que en el capítulo II, dedicado a *S. aureus*, la aplicación de los métodos de caracterización y tipificación en este estudio puede permitir observar la relación existente entre los aislados de las distintas explotaciones y muestras clínicas y también determinar la prevalencia de determinadas cepas en las subpoblaciones estudiadas.

## **MATERIAL Y MÉTODOS.**

### **1.- Microorganismos.**

Para la realización de los experimentos que se describen en el presente capítulo se emplearon 30 cepas de *E. coli* EPEC y 25 de STEC aisladas de muestras de leche de cabra y del ambiente de las explotaciones, además de 9 cepas EPEC y 4 STEC obtenidas de pacientes del Hospital Universitario de León, como se ha descrito en el Capítulo I. Las cepas STEC se identificaron en base a la presencia de los genes que codifican las toxinas Shiga, de ahí la denominación como STEC.

---

Como controles positivos para la realización de las PCR se emplearon las cepas suministradas por la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) y por la Colección Sueca (CCUG) que se muestran en la tabla III.1.

Tabla III.1. . Cepas de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) y de la Colección Sueca (CCUG) empleadas como controles positivos en las reacciones de PCR.

| Nombre/Denominación | Información adicional  |
|---------------------|--|
| CECT 4076           | Cepa de <i>E. coli</i> O157:H7 portadora de los genes <i>stx1</i> , <i>stx2</i> y <i>eae</i> . |
| CCUG 58078          | Cepa de <i>E. coli</i> EPEC, con el gen <i>bfpA</i> .  |

## 2.- Detección de plásmidos en *E. coli*.

Para la extracción de ADN plasmídico se empleó el kit comercial Quantum Prep Plasmid Miniprep Kit (Bio-Rad, Hercules California, EE.UU.) y se siguieron las instrucciones del fabricante descritas a continuación.

Se transfirió 1 ml de cultivo fresco y puro en caldo TSB (Oxoid) a un tubo limpio. Se centrifugó a 11000 *g* durante 30 segundos y se retiró el sobrenadante. Se añadieron 200  $\mu$ l de *Cell Resuspension Solution* y se agitó bien con ayuda del vortex hasta su total resuspensión. Se añadieron 250  $\mu$ l de *Cell Lysis Solution* y se mezcló bien por inversión del tubo unas 10 veces para que se produjera la lisis celular. Se añadieron 250  $\mu$ l de *Neutralization Solution* y se mezcló por inversión del tubo otras 10 veces para detener la lisis. Se centrifugó a 11000 *g* durante 5 minutos. Se transfirió el sobrenadante a un filtro situado sobre un tubo y se añadieron 200  $\mu$ l de *Quantum Prep Mix* mezclando bien con la pipeta. Se centrifugó a 11000 *g* durante 30 segundos. Se descartó el filtrado, se añadieron 500  $\mu$ l de *Wash Buffer* y se centrifugó nuevamente a 11000 *g* durante 30 segundos. Se repitió nuevamente el proceso de lavado, centrifugando ésta segunda vez durante 2 minutos. Se transfirió el filtro a un tubo limpio y se añadieron 100  $\mu$ l de agua Milli-Q para eluir el ADN, y se centrifugó a 11000 *g* durante 1 minuto. En el tubo se obtuvo el ADN plasmídico.

Una alícuota del ADN extraído se cargó en un gel de agarosa (US Biological, Swamscott, MA, EE.UU.) al 1,5 % en TAE 0,5X (Scharlau), y posteriormente para su revelado se sumergió en una solución con 10 mg/ml de bromuro de etidio (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EE.UU.) y el resultado se visualizó como se ha descrito en capítulos anteriores.

El resto del ADN plasmídico se conservó a -20 °C.

### **3.- Detección de genes de patogenicidad mediante PCR.**

Además de los genes detectados para comprobar las cepas aisladas (*stx1*, *stx2* y *eae*) descritos en el Capítulo I, se estudiaron otros genes que permitieran llevar a cabo una mejor caracterización de las cepas, como son el gen que codifica para la adhesina BFP (*bfpA*) (Gunzburg et al., 1995) y varios genes implicados en las lesiones de adhesión y borrado típicas de cepas EPEC, como son, los que codifican para proteínas implicadas en el sistema de secreción tipo III (*espA* y *espB*, con sus tres variantes  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ) y el gen que codifica para el receptor translocado de intimina Tir (*tir*, también con sus 3 variantes,  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ) (China et al., 1999).

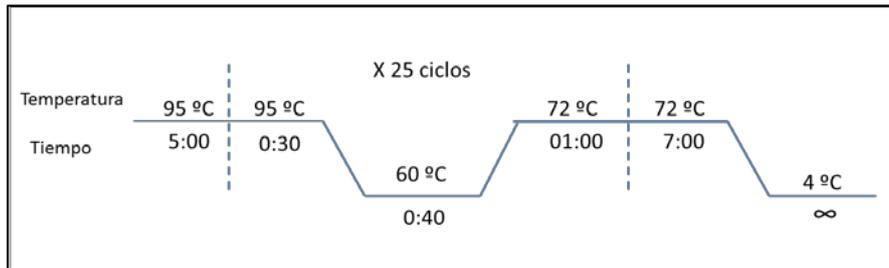
Partiendo del ADN extraído como se describe en el Capítulo I, se llevó a cabo una PCR sencilla para cada uno de estos genes utilizando los pares de cebadores descritos en la tabla III.2.

Tabla III.2. Cebadores empleados en la amplificación de diversos genes asociados a la patogenicidad de *E. coli*.

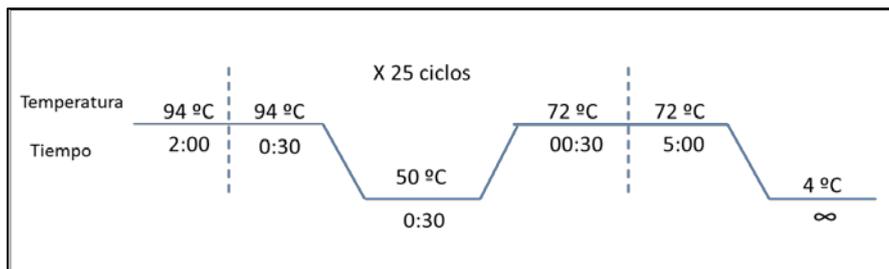
| Gen diana     | Cebador | Secuencia (5'→3')            | Tamaño (pb) | Tª hibridación | Referencia              |       |
|---------------|---------|------------------------------|-------------|----------------|-------------------------|-------|
| <i>bfpA</i>   | EP1     | AATGGTGCTTGCCTTGCTGC         | 326         | 56 °C          | (Gunzburg et al., 1995) |       |
|               | EP2     | GCCGCTTTATCCAACCTGGTA        |             |                |                         |       |
| <i>tir α</i>  | B139    | C(AG)CC(TG)CCA(CT)TACCTTCACA | 342         | 50 °C          |                         |       |
|               | B152    | CGCTAACCTCCAAACCATT          |             |                |                         |       |
| <i>tir β</i>  | B139    | C(AG)CC(TG)CCA(CT)TACCTTCACA | 560         |                |                         |       |
|               | B140    | GATTTTTCCCTCGCCACTA          |             |                |                         |       |
| <i>tir γ</i>  | B139    | C(AG)CC(TG)CCA(CT)TACCTTCACA | 781         |                |                         |       |
|               | B141    | GTCGGCAGTTTCAGTTTCAC         |             |                |                         |       |
| <i>espA α</i> | B163    | TGAGGCATCTAA(AG)G(AC)GTC     | 269         |                |                         | 48 °C |
|               | B165    | GCTGGCTATTATTGACCG           |             |                |                         |       |
| <i>espA β</i> | B163    | TGAGGCATCTAA(AG)G(AC)GTC     | 101         |                | (China et al., 1999)    |       |
|               | B166    | TGCCTTCTTATTCTTGTC           |             |                |                         |       |
| <i>espA γ</i> | B163    | TGAGGCATCTAA(AG)G(AC)GTC     | 172         |                |                         |       |
|               | B164    | ATCACGAATACCAGTTACCA         |             |                |                         |       |
| <i>espB α</i> | B148    | GCCGTTTTTGAGAGCCA            | 94          |                |                         |       |
|               | B151    | TCCCCAGGACAGATGAGAT          |             |                |                         |       |
| <i>espB β</i> | B148    | GCCGTTTTTGAGAGCCA            | 233         | 50 °C          |                         |       |
|               | B149    | CTTCCGTTGCCTTAGT             |             |                |                         |       |
| <i>espB γ</i> | B148    | GCCGTTTTTGAGAGCCA            | 188         |                |                         |       |
|               | B150    | GCACCAGCAGCCTTTGA            |             |                |                         |       |

Para llevar a cabo la técnica de PCR se emplearon los pares de cebadores correspondientes para cada gen, y con un volumen final de 50 µl, se realizó un reacción compuesta por 1 µl de cada cebador preparado a una concentración de 25 µM, 20 µl de Master mix (2,5X, 5-PRIME, Hamburgo, Alemania), 5 µl de ADN muestra y 23 µl de agua Milli-Q estéril. La amplificación del gen se realizó en un termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) bajo las condiciones señaladas a continuación, modificando para cada gen la temperatura de hibridación:

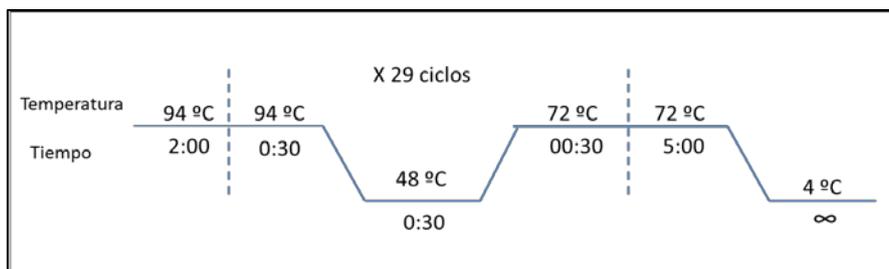
Para el gen *bfpA* (Gunzburg et al., 1995).



Para los genes *tir* ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ) y *espB* ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ) (China et al., 1999).



Para los genes *espA* ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ) (China et al., 1999).



El resultado se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa (US Biological, Swamscott, MA, EE.UU.) al 1,5 % en TAE 0,5X (Scharlau) para el gen *bfpA* y al 2 % en TAE 0,5X (Scharlau) para los otros genes, empleando la tinción y el sistema de documentación de geles descrito en el Capítulo I.

#### 4.- Determinación de grupos filogenéticos de *E. coli*.

Las cepas se asignaron a alguno de los cuatro grupos filogenéticos en que se distribuye *E. coli* (A, B1, B2 y D) basándose en el resultado de una PCR triple que detecta los genes *chuA*, que es un gen necesario para el transporte del grupo hemo en *E. coli* O157:H7, *yjaA*, un gen de función aún desconocida que se ha encontrado en el

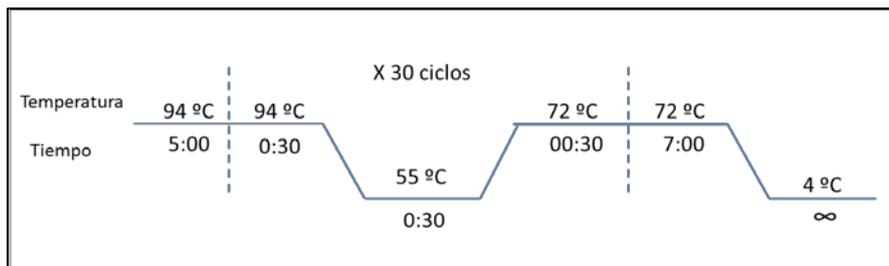
genoma de *E. coli* K-12, y un fragmento de ADN denominado inicialmente como TSPE4.C2 (Clermont et al., 2000) que posteriormente se caracterizó como un gen putativo esterasa lipasa (Gordon et al., 2008).

Para realizar estas tres PCRs utilizamos el ADN extraído como se describe en el Capítulo I, y empleamos los pares de cebadores descritos en la tabla III.3.

Tabla III.3. Cebadores empleados en la amplificación de los genes que permiten establecer una clasificación filogenética de *E. coli*.

| Gen diana   | Cebador   | Secuencia (5'→3')      | Tamaño (pb) | Referencia              |
|-------------|-----------|------------------------|-------------|-------------------------|
| <i>chuA</i> | ChuA.1    | GACGAACCAACGGTCAGGAT   | 279         | (Clermont et al., 2000) |
|             | ChuA.2    | TGCCGCCAGTACCAAAGACA   |             |                         |
| <i>yjaA</i> | YjaA.1    | TGAAGTGTCTCAGGAGACGCTG | 211         |                         |
|             | YjaA.2    | ATGGAGAATGCGTTTCTCAAC  |             |                         |
| TSPE4.C2    | TspE4C2.1 | GAGTAATGTCTGGGGCATTCA  | 152         |                         |
|             | TspE4C2.2 | CGCGCCAACAAAGTATTACG   |             |                         |

Y las siguientes condiciones:



El resultado se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa (US Biological, Swamscott, MA, EE.UU.) al 2 % en TAE 0,5X (Scharlau), empleando la metodología de tinción y visualización descrita en el Capítulo I.

## 5.- Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE).

Se realizó la electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) según el método propuesto por PulseNet (<http://www.pulsenetinternational.org>) (Ribot et al., 2006). El protocolo de PFGE consiste en lo siguiente:

- **Preparación de los bloques de agarosa a partir de cultivo en placa.**

Partiendo de una colonia de una cepa aislada, se sembró en medio TSA (Oxoid) y se incubó a 37 °C durante 18 horas. Con un asa de siembra se recogió una porción de cultivo bacteriano para preparar una suspensión celular en *Cell Suspension Buffer* (CSB; 100 mM Tris, 100 mM EDTA) que medida a 420 nm daba una absorbancia de 0,6. Para medir la absorbancia se utilizó un espectrofotómetro Uvikon 810 (Kontron Analytical, Redwood City, California, EE.UU.). Se preparó agarosa *SeaKem Gold* (Lonza, Rockland, Maine, EE.UU.) al 1 % mezclando la agarosa con buffer TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA), se fundió calentando suavemente en el microondas, y posteriormente se transfirió a un baño precalentado a 60 °C para atemperarla antes de su uso. Se transfirieron 400 µl de la suspensión celular a un tubo estéril de 1,5 ml, al que se añadieron 20 µl de proteinasa K (Sigma-Aldrich) (20 mg/ml) y 400 µl de la agarosa *SeaKem Gold* (Lonza) atemperada a 60 °C, y tras mezclar bien los tres componentes se rellenaron rápidamente los moldes evitando la formación de burbujas. Se dejó solidificar la agarosa en los moldes durante 15 minutos a temperatura ambiente y 5 minutos a 4 °C.

- **Lisis celular.**

Se transfirió cada bloque de agarosa a un tubo de polipropileno de 50 ml debidamente identificado, en el cual se añadieron 5 ml de *Cell Lysis Buffer* (CLB; 50 mM Tris:50 mM EDTA y 1 % Sarcosyl) y 25 µl de proteinasa K (20 mg/ml), y se incubó en un baño de agua (Julabo SW22, Seelbach, Alemania) a 55 °C, durante 2 horas con una agitación constante de 150 rpm. Transcurrido el tiempo de lisis se realizaron varios lavados. Dos lavados iniciales a 50 °C y 150 rpm con 10 ml/tubo de agua Milli-Q durante 20 minutos, y tres lavados finales con 10 ml/tubo de buffer TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA) durante 20 minutos en las mismas condiciones. Finalmente se retiró el TE del último lavado, se añadieron 10 ml/tubo de TE fresco y se guardó a 4 °C.

- **Digestión del ADN.**

Se cortó un tercio del bloque de agarosa que se empleó para llevar a cabo la digestión, guardando el resto nuevamente a 4 °C. Antes de llevar a cabo la digestión se realizó una pre-incubación del fragmento en un tubo de 1,5 ml con 100 µl del tampón

---

de restricción buffer H, (Fermentas - Thermo Scientific, Vilnius, Lituania), y se incubó a 37 °C durante 10 minutos en un termobloque, Thermomixer compact (Eppendorf). Transcurrido el tiempo de pre-incubación se retiró el tampón y se añadieron, en el mismo tubo 10 µl del buffer H (10X) y 1 µl de la enzima de restricción FastDigest *Xba* I (Fermentas - Thermo Scientific), completando el volumen de 100 µl con agua Milli-Q, y se incubó durante 2 horas a 37 °C en un termobloque, Thermomixer compact (Eppendorf).

- **Preparación del gel de agarosa y de la cubeta de electroforesis.**

Se preparó una solución de agarosa *SeaKem Gold* (Lonza) al 1 % en buffer EDTA Tris-Borato (TBE) 0,5X (Scharlau), que se fundió con ayuda de un microondas y se mantuvo atemperado a 55 °C hasta el momento de su uso.

En cada tanda de PFGE se procesaron 12 muestras problema y 3 muestras del patrón de referencia *Salmonella* serotipo Braenderup (H9812) (ATCC BAA-664), utilizando un peine de 15 pocillos.

Se montó el molde para hacer el gel, nivelándolo correctamente y sellando con agarosa fundida los bordes del molde. Se colocaron los *plugs* sobre el extremo del peine, uno en cada diente, fijándolos con una gota de agarosa. Una vez solidificada la agarosa, el peine se colocó sobre el molde y se vertió el resto de la agarosa dejando solidificar lentamente a temperatura ambiente durante 20 minutos.

Mientras se solidificaba la agarosa se añadieron en la cubeta dos litros de TBE 0,5X (Scharlau) y tiourea (Alfa Aesar GmbH & Co KG, Karlsruhe, Alemania) a concentración final 0,4 µl/ml, y se atemperó a 14 °C.

Una vez solidificado el gel se retiró el peine, se desmoldó y se colocó sobre la plataforma en la cubeta de electroforesis. Las condiciones para llevar a cabo la electroforesis en el equipo CHEF DR III (Bio-Rad) fueron:

Pulso inicial: 2,2 s

Pulso final: 54,2 s

Voltaje: 6 V/cm

Ángulo de inclinación: 120°

Tiempo: 19 horas

- **Visualización del resultado.**

Transcurrido el tiempo de electroforesis se tiñó el gel sumergiéndolo en una cubeta con bromuro de etidio (10 mg/ml) durante 60 minutos y posteriormente en otra cubeta con agua destilada durante 30 minutos. El resultado se visualizó y se documentó empleando la metodología descrita anteriormente.

El análisis de las imágenes para la obtención del correspondiente dendrograma se realizó empleando el software GelCompar II 6.5 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Bélgica), utilizando como coeficiente de similitud Dice, 1 % de optimización y 1 % de tolerancia, y usando el UPGMA como método para agruparlas.

## **6.- Tipificación Multilocus de Secuencias (MLST) y análisis filogenético.**

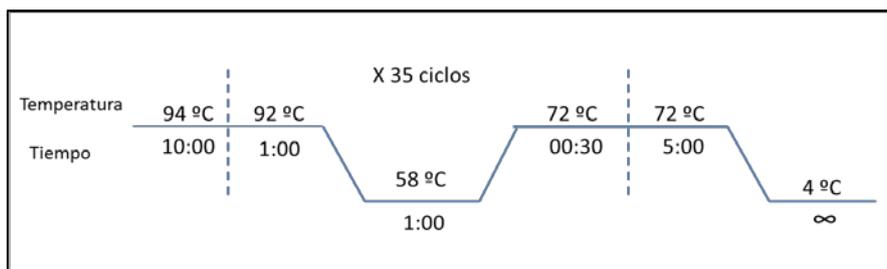
Se llevó a cabo la amplificación, purificación y secuenciación de once genes *housekeeping* recomendados por EcMLST (*arcA*, *aspC*, *clpX*, *cyaA*, *fadD*, *icdA*, *lysP*, *mdh*, *mtlD*, *rpoS*, *uidA*). El protocolo seguido para el análisis MLST junto con los cebadores utilizados fue el propuesto en la página web de EcMLST (<http://www.shigatox.net/mlst>).

Los cebadores utilizados en las PCRs de los genes para la técnica MLST están recogidos en la tabla III.4.

Tabla III.4. Cebadores empleados en la amplificación de genes *housekeeping* recomendados por EcMLST.

| Gen diana   | Cebador   | Secuencia (5'→3')        | Tamaño (pb) | Referencia            |
|-------------|-----------|--------------------------|-------------|-----------------------|
| <i>arcA</i> | arcA-F1   | GACAGATGGCGCGGAAATGC     | 552         | www.shigatox.net/mlst |
|             | arcA-R2   | TCCGGCGTAGATTCGAAATG     |             |                       |
| <i>aspC</i> | aspC-F4   | GTTTCGTGCCGATGAACGTC     | 594         |                       |
|             | aspC-R7   | AAACCCTGGTAAGCGAAGTC     |             |                       |
| <i>clpX</i> | clpX-F6   | CTGGCGGTCGCGGTATACAA     | 672         |                       |
|             | clpX-R1   | GACAACCGGCAGACGACCAA     |             |                       |
| <i>cyaA</i> | cyaA-F3   | CTCGTCCGTAGGGCAAAGTT     | 571         |                       |
|             | cyaA-R3   | AATCTCGCCGTCGTGCAAAC     |             |                       |
| <i>fadD</i> | fadD-F6   | GCTGCCGCTGTATCACATTT     | 580         |                       |
|             | fadD-R3   | GCGCAGGAATCCTTCTTCAT     |             |                       |
| <i>icdA</i> | icd-F2    | CTGCGCCAGGAACTGGATCT     | 669         |                       |
|             | icd-R2    | ACCGTGGGTGGCTTCAAACA     |             |                       |
| <i>lysP</i> | lysP-F1   | CTTACGCCGTGAATTAAGG      | 628         |                       |
|             | lysP-R8   | GGTTCCTGGAAAGAGAAGC      |             |                       |
| <i>mdh</i>  | mdh-F3    | GTCGATCTGAGCCATATCCCTAC  | 650         |                       |
|             | mdh-R4    | TACTGACCGTCGCCTTCAAC     |             |                       |
| <i>mtlD</i> | mtlD-F2   | GCAGGTAATATCGGTCGTGG     | 658         |                       |
|             | mtlD-R3   | CGAGGTACGCGTTATAGCAT     |             |                       |
| <i>rpoS</i> | rpoS-F3   | CGCCGGATGATCGAGAGTAA     | 618         |                       |
|             | rpoS-R1   | GAGGCCAATTTACGACCTA      |             |                       |
| <i>uidA</i> | uidA-277F | CATTACGGCAAAGTGTGGGTCAAT | 658         |                       |
|             | uidA-934R | CCATCAGCACGTTATCGAATCCTT |             |                       |

Para llevar a cabo la PCR se emplearon los pares de cebadores correspondientes para cada gen, y con un volumen final de 50 µl, se realizó un reacción compuesta por 1 µl de cada cebador preparado a una concentración de 25 µM, 20 µl de Master mix (2,5X, 5-PRIME, Hamburgo, Alemania), 5 µl de ADN muestra y 23 µl de agua Milli-Q estéril. La amplificación del gen se realizó en un termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) bajo las siguientes condiciones:



Los productos de PCR obtenidos se purificaron empleando el kit *NucleoSpin Gel and PCR Clean-up* (Macherey-Nagel, Düren, Alemania) tal y como se describe en el Capítulo II.

Las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo en el Laboratorio de Técnicas Instrumentales (LTI) de la Universidad de León empleando el secuenciador Megabace 500 (Amersham Biosciences, Piscataway, New Jersey, EE.UU.) con los mismos cebadores utilizados en la amplificación.

Las secuencias obtenidas se revisaron y editaron empleando el software Chromas Lite 2.1 (<http://technelysium.com.au>). Comparando las secuencias con las depositadas en la base de datos de la web de EcMLST (<http://www.shigatox.net/mlst>), se pudo asignar un número de alelo a cada uno de los locus obtenidos para cada gen. A cada cepa, en función del perfil de alelos que presentaba, se le asignó un número de *sequence type* (ST). Con estos datos y empleando el software START2 (*Sequence Type Analysis and Recombinational Test Versión 2*) (Jolley et al., 2001) y el algoritmo eBurst se realizó un árbol filogenético que permitió una mejor visualización de los grupos clonales.

Finalmente se construyeron secuencias concatenadas a partir de las secuencias individuales de los diferentes genes de una cepa representativa de cada uno de los ST. Se realizó una prueba de recombinación de las secuencias con SplitsTree (Huson & Bryant, 2006) para diferenciar entre recombinación y mutaciones recurrentes. Se alinearon estas secuencias y se construyó el árbol filogenético correspondiente utilizando el método Neighbor-Joining (NJ) estimando las distancias con el modelo de parámetro-2 de Kimura y un *bootstrap* de 1000 repeticiones utilizando el software MEGA5 (<http://www.megasoftware.net/>).

## 7.- Dry SPOT *E. coli* O157 latex test.

Los aislados sospechosos de ser *E. coli* STEC se sometieron a una prueba de aglutinación de látex para la identificación de *E. coli* serogrupo O157, Dryspot *E. coli* O157 test (Oxoid, Hampshire, Reino Unido).

Para la realización de esta prueba se partió de un cultivo puro sembrado en SMAC e incubado a 37 °C durante 24 horas y se siguió el protocolo descrito por el fabricante. Inicialmente se añadió una gota de PBS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EE.UU.) en el área de prueba de la tarjeta evitando el contacto del líquido con los reactivos de látex desecados. Se tomó una colonia sospechosa con una espátula de las suministradas con el equipo y se aplicó sobre el área control mezclándola con el PBS hasta obtener de una suspensión ligeramente uniforme que acto seguido se extendió, con la espátula, la suspensión por el área de reacción hacia las manchas de látex desecado, hasta su completa disolución cubriendo toda el área de reacción. La tarjeta está provista de un área de control para comprobar que no existe autoaglutinación.

Se consideró un resultado positivo, y por lo tanto presencia del serotipo O157, cuando se produjo una aglutinación de las partículas de látex en un lapso de tiempo no superior a 60 segundos y no se producía aglutinación en la prueba control. Cualquier reacción producida después de 60 segundos se consideró negativa.

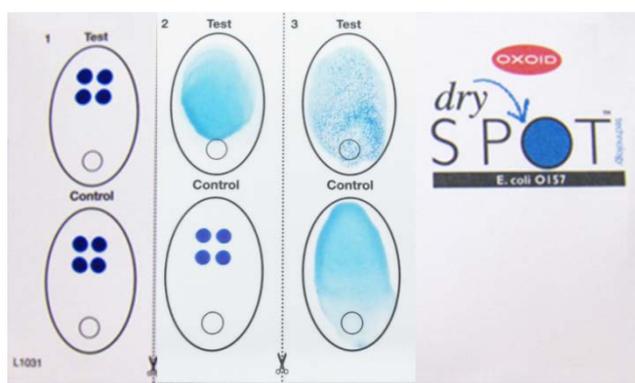


Figura III.2. Imagen de las tarjetas utilizadas para la realización de la prueba Dryspot *E. coli* O157 test. (1) Pruebas sin utilizar. (2) Resultado negativo. (3) Resultado positivo.

## 8.- Serotipado de *E. coli*.

Todas las cepas aisladas, tanto de explotaciones como de pacientes de gastroenteritis diagnosticados en el Hospital Universitario de León, que poseían alguno de los genes que codifican para las toxinas Stx1 y Stx2 o ambas, y el gen que codifica para la intimina, se enviaron al Laboratorio de Referencia de *E. coli* (Universidad de Santiago de Compostela, Lugo, España) para llevar a cabo la serotipificación de los antígenos somáticos (O) y flagelar (H).

## 9.- Metabolismo de carbohidratos.

Para conocer el perfil de comportamiento respecto al metabolismo de los carbohidratos en los aislados de EPEC, y para analizar un gran número de ellos bajo las mismas condiciones se empleó un sistema estandarizado compuesto por 50 ensayos bioquímicos destinados al estudio del metabolismo de dichos compuestos por los microorganismos, utilizando las galerías API 50 CH (bioMérieux, Lyon, Francia).

Una galería API 50 CH está compuesta por 50 microtubos que permite el estudio de la fermentación de substratos, perteneciente a la familia de los hidratos de carbono, y derivados (heterósidos, polialcoholes, ácidos urónicos). Los que se incluyen en esta galería se relacionan en la tabla III.5.

Tabla III.5. Relación de carbohidratos presentes en la galería API 50 CH.

| <b>Tubo</b> | <b>Ensayo</b> | <b>Compuestos activos</b>  | <b>Cant. (mg/cúpula)</b> |
|-------------|---------------|----------------------------|--------------------------|
| 0           | 0             | TESTIGO                    | -                        |
| 1           | GLY           | Glicerol                   | 1,64                     |
| 2           | ERY           | Eritritol                  | 1,44                     |
| 3           | DARA          | D-Arabinosa                | 1,4                      |
| 4           | LARA          | L-Arabinosa                | 1,4                      |
| 5           | RIB           | D-Ribosa                   | 1,4                      |
| 6           | DXYL          | D-Xilosa                   | 1,4                      |
| 7           | LXYL          | L-Xilosa                   | 1,4                      |
| 8           | ADO           | D-Adonitol                 | 1,36                     |
| 9           | MDX           | Metil-βD-Xilopiranosida    | 1,28                     |
| 10          | GAL           | D-Galactosa                | 1,4                      |
| 11          | GLU           | D-Glucosa                  | 1,56                     |
| 12          | FRU           | D-Fructosa                 | 1,4                      |
| 13          | MNE           | D-Mamnosa                  | 1,4                      |
| 14          | SBE           | L-Sorbosa                  | 1,4                      |
| 15          | RHA           | L-Rhamnosa                 | 1,36                     |
| 16          | DUL           | Dulcitol                   | 1,36                     |
| 17          | INO           | Inositol                   | 1,4                      |
| 18          | MAN           | D-Manitol                  | 1,36                     |
| 19          | SOR           | D-Sorbitol                 | 1,36                     |
| 20          | MDM           | Metil-αD-Manopiranosida    | 1,28                     |
| 21          | MDG           | Metil-αD-Glucopiranosida   | 1,28                     |
| 22          | NAG           | N-AcetilGlucosamina        | 1,28                     |
| 23          | AMY           | Amigdalina                 | 1,08                     |
| 24          | ARB           | Arbutina                   | 1,08                     |
| 25          | ESC           | Esculina / Citrato férrico | 1,16 / 0,152             |
| 26          | SAL           | Salicina                   | 1,04                     |
| 27          | CEL           | D-Celobiosa                | 1,32                     |
| 28          | MAL           | D-Maltosa                  | 1,4                      |
| 29          | LAC           | D-Lactosa (origen bobino)  | 1,4                      |
| 30          | MEL           | D-Melibiosa                | 1,32                     |
| 31          | SAC           | D-Sacarosa                 | 1,32                     |
| 32          | TRE           | D-Trehalosa                | 1,32                     |
| 33          | INU           | Inulina                    | 1,28                     |
| 34          | MLZ           | D-Melezitosa               | 1,32                     |
| 35          | RAF           | D-Rafinosa                 | 1,56                     |
| 36          | AMD           | Almidón                    | 1,28                     |
| 37          | GLYG          | Glicógeno                  | 1,28                     |
| 38          | XLT           | Xilitol                    | 1,4                      |
| 39          | GEN           | Gentiobiosa                | 0,5                      |
| 40          | TUR           | D-Turanosa                 | 1,32                     |
| 41          | LYX           | D-Lixosa                   | 1,4                      |
| 42          | TAG           | D-Tagarosa                 | 1,4                      |
| 43          | DFUC          | D-Fucosa                   | 1,28                     |
| 44          | LFUC          | L-Fucosa                   | 1,28                     |
| 45          | DARL          | D-Arabitol                 | 1,4                      |
| 46          | LARL          | L-Arabitol                 | 1,4                      |
| 47          | GNT           | Gluconato potásico         | 1,84                     |
| 48          | 2KG           | 2-cetogluconato potásico   | 2,12                     |
| 49          | 5KG           | 5-cetogluconato potásico   | 1,8                      |

Para la realización de este ensayo se partió de un cultivo puro sembrado en TSA (Oxoid) incubado a 37 °C durante 18 horas y se siguió el siguiente protocolo:

- Se tomaron varias colonias para realizar una suspensión en 1 ml de agua destilada estéril hasta obtener una turbidez igual al patrón 4 de McFarland.
- Se transfirió la suspensión a 14 ml de caldo Rojo Fenol (Scharlau, Barcelona, España) estéril y se homogeneizó.
- Se repartió la suspensión entre cada uno de los 50 microtubos que componen la galería API 50 CH con ayuda de una pipeta Pasteur y se recubrieron las cúpulas con aceite de parafina.
- Las galerías se incubaron a 37 °C durante 6, 24 y 48 horas, anotándose el resultado en todos los tiempos.

Durante el periodo de incubación, la fermentación se traduce en un cambio de color en el microtubo, debido a la producción de ácido en anaerobiosis revelada por el indicador de pH del medio elegido. En nuestro caso se empleó caldo Rojo Fenol, y por lo tanto el viraje de color fue del rojo inicial al amarillo-anaranjado tras llevarse a cabo la fermentación, excepto en el caso del ensayo para la esculina (microtubo nº 25) en el cual se debe observar un viraje del color rojo a negro, como se puede apreciar en la figura III.3.

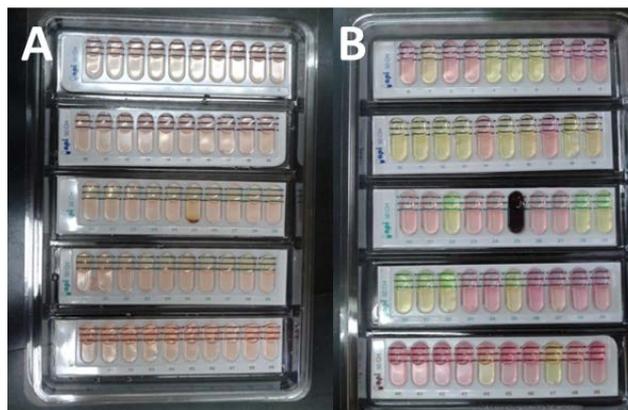


Figura III.3. Galería API 50 CH inoculada antes de la incubación (A) y después, tras producirse la fermentación de algunos carbohidratos (B).

---

Los resultados obtenidos se codificaron como positivo (1) o negativo (0) y se trataron estadísticamente empleando el software SPSS (IBM, Rochester, Minnesota, EE. UU) y el método de concordancia simple y UPGMA para obtener un dendrograma que nos relacionara las distintas cepas estudiadas.

## RESULTADOS.

### 1.- Detección de plásmidos y genes asociados a los mismos en *E. coli*.

Mediante el empleo del kit comercial para extraer ADN plasmídico y su posterior comprobación en un gel de agarosa, se confirmó que todas las cepas de *E. coli* aisladas de explotaciones caprinas que contenían el gen *eae* (40 cepas) poseían al menos un plásmido entre su material genético, lo cual nos hizo pensar que podría tratarse del plásmido EAF, y además la amplificación por PCR del gen *bfpA*, incluido en el plásmido EAF, daba lugar a la aparición de una banda de un tamaño menor del esperado (figura III.4). La posterior secuenciación del fragmento demostró que se trataba de un ADN quimérico, descartando, por tanto, la presencia del pEAF.

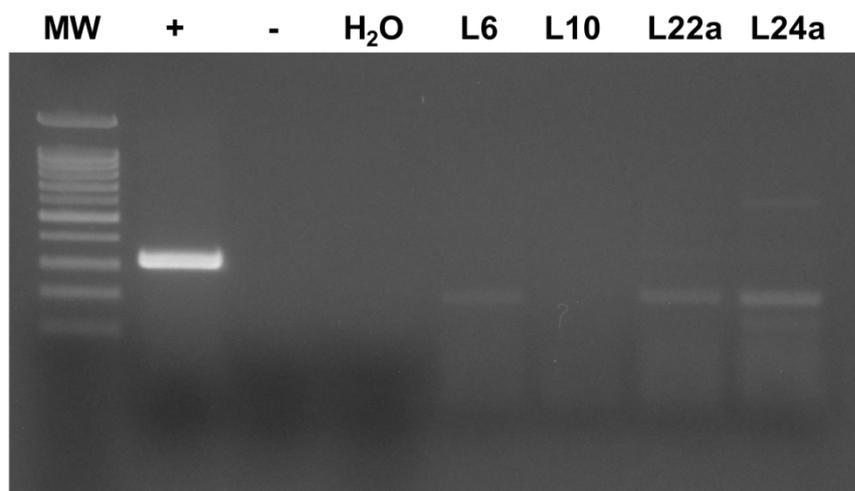


Figura III.4. Resultado de la PCR de amplificación del gen *bfpA*.

## 2.- Detección de genes de patogenicidad mediante PCR.

En el Capítulo I se comprobó la presencia o no de los genes que codifican para las toxinas Stxs, *stx1* y *stx2*, y el gen de la intimina, *eae*, en las cepas de *E. coli* aisladas. En este capítulo se investigó la presencia de otros genes que regulan diferentes factores de virulencia en las 30 cepas EPEC aisladas de leche de cabra y de muestras tomadas en explotaciones caprinas.

Además del gen *bfpA*, relacionado con el plásmido pEAF, se estudiaron otros implicados en las lesiones de adhesión y borrado presentes en la isla de patogenicidad LEE. Estos otros genes fueron: los que codifican para proteínas implicadas en el sistema de secreción tipo III (*espA* y *espB*, con sus tres variantes  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ) y el gen que codifica para el receptor translocado de intimina Tir (*tir*, también con sus tres variantes,  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ). Los resultados de las distintas PCRs que se realizaron se muestran en la tabla III.6 y en la figura III.5.

Tabla III.6. Resultados de las PCRs llevadas a cabo para detectar la presencia de distintos genes codificados en la isla de patogenicidad LEE. Los colores mostrados en ella son equivalentes a los de la representación gráfica de los distintos patrones mostrados en la figura III.5.

| CEPA    | tir- $\alpha$ | tir- $\beta$ | tir- $\gamma$ | espA- $\alpha$ | espA- $\beta$ | espA- $\gamma$ | espB- $\alpha$ | espB- $\beta$ | espB- $\gamma$ |
|---------|---------------|--------------|---------------|----------------|---------------|----------------|----------------|---------------|----------------|
| L6EAS   | +             | +            |               | +              |               |                | +              | +             |                |
| L29aEAS |               | +            |               | +              | +             |                | +              | +             |                |
| L29bEAS |               | +            |               | +              | +             |                | +              | +             |                |
| L36EAS  |               | +            |               | +              | +             |                | +              | +             |                |
| L37aEAS | +             |              |               | +              | +             |                | +              |               |                |
| L37bEAS | +             | +            |               | +              | +             |                | +              |               |                |
| L42bEAS |               | +            |               | +              | +             |                | +              | +             |                |
| L50EAS  | +             |              |               | +              | +             |                | +              |               |                |
| L53EAS  |               | +            |               | +              | +             |                | +              | +             |                |
| P36EAS  |               | +            |               | +              | +             |                | +              | +             |                |
| P41EAS  | +             |              |               | +              | +             |                | +              |               |                |
| P46EAS  |               |              | +             |                |               |                |                | +             | +              |
| H20EAS  |               | +            |               | +              | +             |                | +              | +             |                |
| H24aEAS |               | +            |               | +              | +             |                |                | +             |                |
| H25aEAS |               | +            |               | +              | +             |                | +              | +             |                |
| H25bEAS |               | +            |               | +              | +             |                | +              | +             |                |
| H26cEAS |               | +            |               | +              | +             |                |                | +             |                |
| H32EAS  |               | +            |               | +              | +             |                | +              | +             |                |
| H32bEAS | +             |              |               | +              | +             |                | +              |               |                |
| H35EAS  |               | +            |               | +              | +             |                | +              | +             |                |
| H36EAS  |               | +            |               | +              | +             |                |                | +             |                |
| H39EAS  | +             |              |               | +              | +             |                | +              |               |                |
| H44EAS  | +             |              |               | +              |               |                | +              |               |                |
| H46EAS  | +             |              |               | +              | +             |                | +              |               |                |
| H48EAS  | +             |              |               | +              |               |                | +              |               |                |
| H50EAS  | +             |              |               | +              |               |                | +              |               |                |
| H53EAS  |               | +            |               | +              | +             |                |                | +             |                |
| H54EAS  |               | +            |               | +              | +             |                |                | +             |                |
| H62EAS  |               |              |               |                |               |                |                |               |                |
| H66EAS  | +             |              |               | +              | +             |                | +              |               |                |

Todas las cepas excepto la H62EAS poseían alguna de las variantes de estos tres genes. Se obtuvieron siete combinaciones diferentes teniendo en cuenta las distintas variantes de genes LEE. El número de cepas correspondiente a cada combinación está representado en la tabla III.6 y la figura III.5 con los mismos colores. La cepa P46EAS difiere claramente del resto de cepas ya que posee la variante  $\gamma$  del gen *tir*, carece del

gen *espA*, y, a diferencia del resto de cepas que poseían las variantes  $\alpha$  y/o  $\beta$  del gen *espB*, ésta presenta las variables  $\beta$  y  $\gamma$  de dicho gen. La cepa L37bEAS es portadora de dos variantes del gen *tir* ( $\alpha$  y  $\beta$ ); el resto de cepas presentaban una sola de las variantes de gen *tir*, o la  $\alpha$  o la  $\beta$ , pero nunca ambas juntas en el genoma. En cuanto al gen *espA* la mayoría presentan ambas variantes, tanto  $\alpha$  como  $\beta$ , y las cuatro cepas que solo presentan una, ésta es la variante  $\alpha$ . No ocurre lo mismo con el gen *espB* que presenta mayor variabilidad puesto que hay cepas que poseen las variantes  $\alpha$  y  $\beta$  en el mismo genoma, o solamente una de ellas.

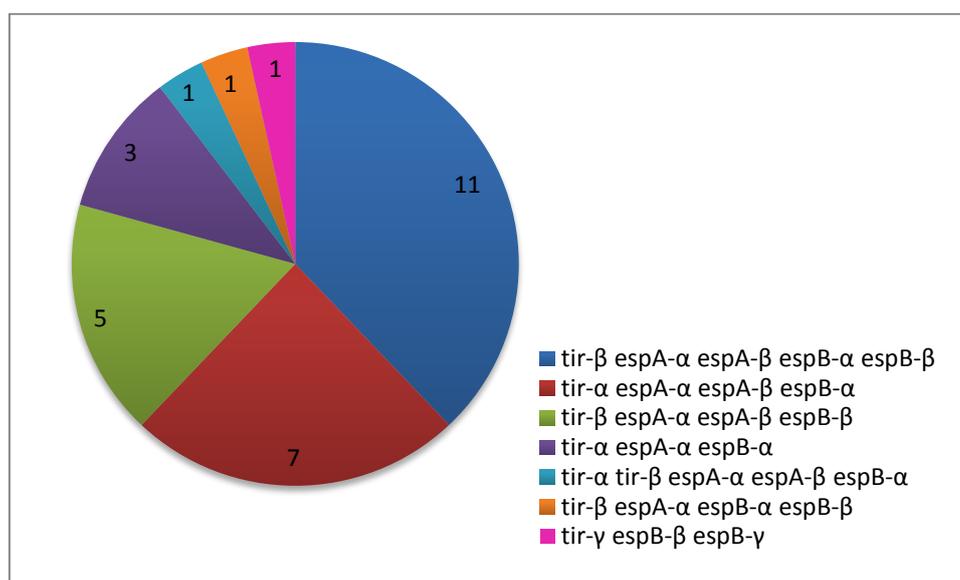


Figura III.5. Representación gráfica del número de aislados correspondientes a cada patrón de genes codificados en la isla de patogenicidad LEE obtenidos.

### 3.- Determinación de grupos filogenéticos de *E. coli*.

El resultado de la PCR triple realizada para hacer una determinación de los grupos filogenéticos de las cepas de *E. coli* basándose en la presencia o ausencia de los genes *chuA*, *YjaA* y *TspE4C2* permitió asignar cada cepa a un grupo filogenético (tabla III.7).

En la figura III.6 se representa la prevalencia de cada grupo filogenético para la población estudiada. Diecisiete de las cepas de *E. coli* pertenecen al grupo filogenético A, de las cuales 15 son cepas EPEC atípicas y dos son cepas STEC, 38 pertenecen al grupo filogenético B1, de las cuales 23 son cepas EPEC atípicas y 15 cepas STEC, cinco

pertenecen al grupo B2 y son una EPEC atípica y cuatro STEC, y siete al grupo D, siendo todas ellas cepas STEC, de acuerdo con el esquema propuesto por Clermont et al. (2000).

Tabla III.7. Distribución de las cepas estudiadas en cada grupo filogenético.

|              |      | Expl. caprinas |              | Clínicas  |             | TOTAL     |              |
|--------------|------|----------------|--------------|-----------|-------------|-----------|--------------|
| A            | EPEC | 9              | 12 (21,82 %) | 6         | 6 (46,16 %) | 15        | 18 (26,47 %) |
|              | STEC | 3              |              | 0         |             |           |              |
| B1           | EPEC | 21             | 33 (60,00 %) | 2         | 5 (38,46 %) | 23        | 38 (55,88 %) |
|              | STEC | 12             |              | 3         |             |           |              |
| B2           | EPEC | 0              | 4 (7,28 %)   | 1         | 1 (7,69 %)  | 1         | 5 (7,35 %)   |
|              | STEC | 4              |              | 0         |             |           |              |
| D            | EPEC | 0              | 6 (10,90 %)  | 0         | 1 (7,69 %)  | 0         | 7 (10,30 %)  |
|              | STEC | 6              |              | 1         |             |           |              |
| <b>Total</b> |      | <b>55</b>      |              | <b>13</b> |             | <b>68</b> |              |

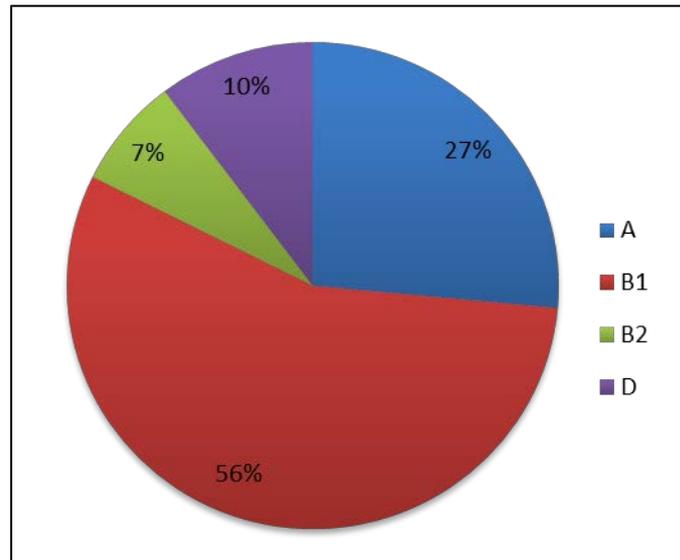


Figura III.6. Distribución de los grupos filogenéticos de *E. coli*.

#### 4.- Electroforesis en Gel de Campo Pulsado.

El resultado de la electroforesis en campo pulsado (PFGE) realizada para genotipar las cepas de *E. coli* según el método descrito en material y métodos del presente capítulo permitió agrupar las 66 cepas en función de los diversos patrones de bandas obtenidos en 13 grupos o *clusters* (letras A a M) y 22 perfiles únicos, con un 76 % de similitud.

Como se observa en la figura III.7, el grupo A incluye dos cepas EPEC, una de origen humano (clínica) y la otra aislada de heces caprinas en suelo que se parecen entre sí en un 76,9 %.

Los grupos C y K también están compuestos por cepas de ambos orígenes. El C incluye tres cepas EPEC (una de origen humano y dos de heces caprinas) que se parecen entre sí en un 77,4 %, y el K incluye cinco cepas STEC (una clínica y cuatro aisladas de leche de cabra con un parecido entre ambos orígenes del 78%).

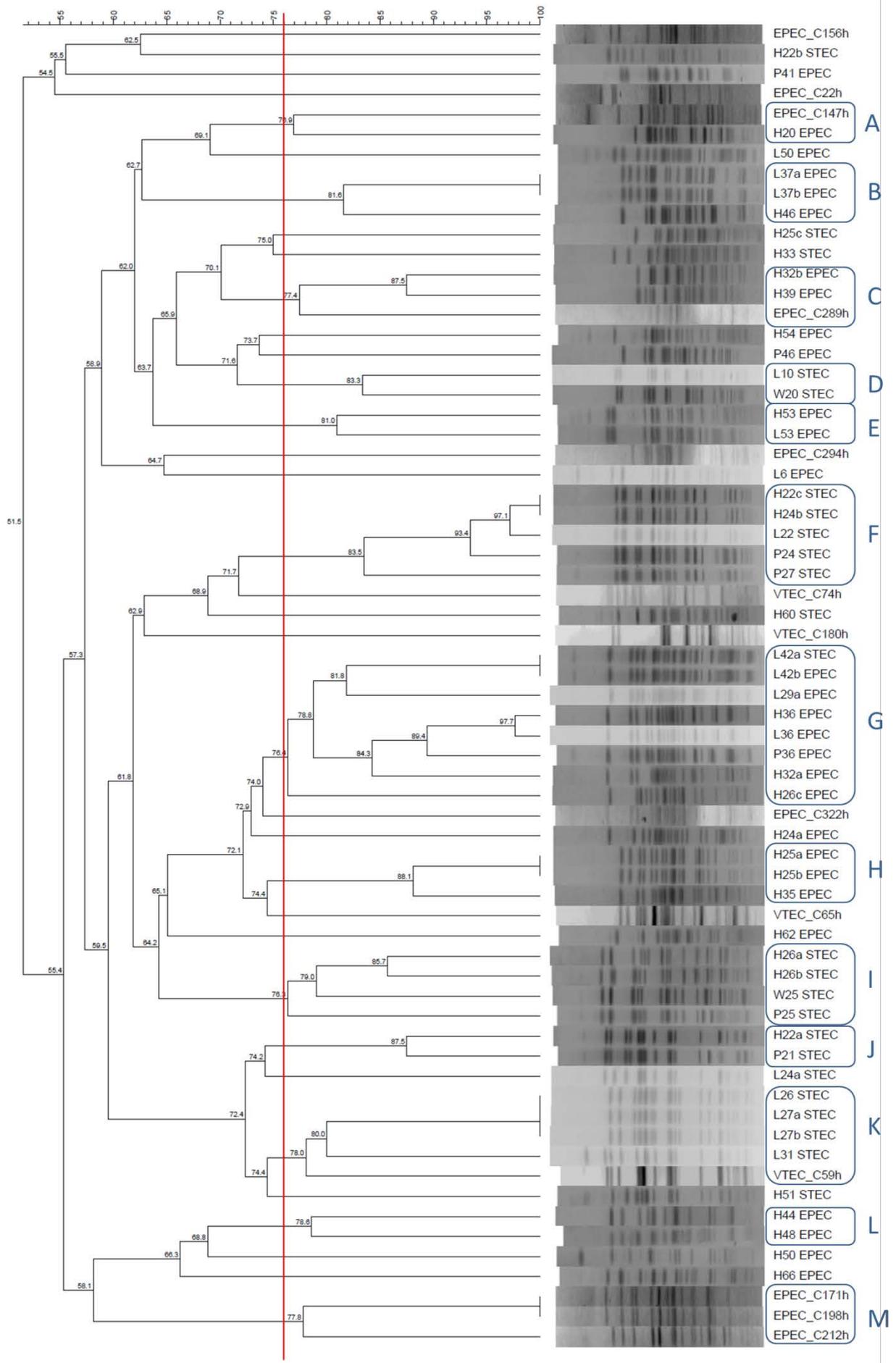
El grupo G incluye tanto cepas STEC (una cepa) como EPEC (siete cepas) todas ellas aisladas de leche o de muestras de explotaciones caprinas (pienso y heces de cabra en suelo).

El grupo M incluye tres cepas EPEC, todas ellas de origen humano, dos de ellas idénticas entre sí.

El resto de clústers compuestos por entre dos y cuatro cepas incluyen cepas del mismo patotipo y no presentan relaciones de origen reseñables.

En general, las cepas clínicas se agrupan con las aisladas de explotaciones caprinas, demostrando que existe cierta similitud entre ellas, así como también se observa una relación entre las cepas EPEC y STEC al no diferenciarse en dos grandes *clusters* independientes.

Figura III.7. Dendrograma resultado de la realización de la técnica PFGE sobre las cepas de *E. coli* aisladas de leche y explotaciones caprinas (... EPEC/STEC) y de muestras clínicas (EPEC/STEC–C...).



## 5.- Tipificación Multilocus de Secuencias (MLST) y análisis filogenético.

Se secuenciaron once genes *housekeeping* recomendados por EcMLST (*arcA*, *aspC*, *clpX*, *cyaA*, *fadD*, *icdA*, *lysP*, *mdh*, *mtlD*, *rpoS*, *uidA*). En algunos casos, no fue posible obtener secuencias coherentes para todos los genes, descartándose esas cepas del análisis. El análisis de 54 cepas de *E. coli* aisladas de muestra de leche y de muestras tomadas en explotaciones caprinas dio como resultado 24 perfiles de alelos o *sequence types* (ST) diferentes atendiendo al análisis de siete genes recomendado por EcMLST (*aspC*, *clpX*, *fadD*, *icdA*, *lysP*, *mdh*, y *uidA*) (tabla III.8). El perfil de alelos más frecuente fue ST 106 (23,08 %) e incluye cepas tanto EPEC como STEC sumando un total de 12 cepas (11 EPEC y una STEC). La frecuencia de alelos distintos para cada locus varía entre cinco y nueve. Se identificaron cuatro alelos nuevos en dos genes diferentes (tabla III.8) y se registraron como nuevos alelos en la base de datos de la web de EcMLST (<http://www.shigatox.net/mlst>). En cuanto a los perfiles de alelos (ST) también se detectaron 16 distintos que no se correspondían con ninguno de los descritos previamente y se incorporaron en la base de datos de la web de EcMLST.

Tabla III.8. Resumen del análisis MLST de 54 cepas de *E. coli* atendiendo a siete genes *housekeeping*. En rojo se marcan tanto los nuevos alelos como los nuevos ST detectados.

| ST   | Nº alelo de cada gen |             |             |             |             |            |             | Frecuencia relativa | Patotipo |
|------|----------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|-------------|---------------------|----------|
|      | <i>aspC</i>          | <i>clpX</i> | <i>fadD</i> | <i>icdA</i> | <i>lysP</i> | <i>mdh</i> | <i>uidA</i> |                     |          |
| 106  | 7                    | 8           | 2           | 4           | 1           | 5          | 8           | 12                  | Ambos    |
| 89   | 5                    | 5           | 5           | 2           | 3           | 5          | 5           | 5                   | STEC     |
| 66   | 1                    | 1           | 4           | 3           | 2           | 4          | 4           | 4                   | STEC     |
| 157  | 7                    | 5           | 20          | 23          | 1           | 29         | 1           | 4                   | EPEC     |
| 119  | 4                    | 2           | 2           | 2           | 1           | 2          | 2           | 3                   | EPEC     |
| 433  | 4                    | 37          | 1           | 15          | 1           | 1          | 1           | 3                   | EPEC     |
| 1094 | 173                  | 2           | 29          | 200         | 19          | 20         | 202         | 3                   | STEC     |
| 1090 | 5                    | 5           | 5           | 2           | 3           | 5          | 259         | 2                   | STEC     |
| 1088 | 1                    | 19          | 13          | 4           | 1           | 12         | 1           | 1                   | STEC     |
| 1085 | 3                    | 2           | 2           | 2           | 1           | 2          | 2           | 1                   | EPEC     |
| 1086 | 4                    | 3           | 1           | 1           | 1           | 1          | 1           | 1                   | EPEC     |
| 148  | 4                    | 5           | 2           | 4           | 1           | 5          | 1           | 1                   | STEC     |
| 1091 | 4                    | 5           | 5           | 2           | 3           | 5          | 259         | 1                   | STEC     |
| 1081 | 4                    | 19          | 13          | 39          | 1           | 17         | 260         | 1                   | EPEC     |
| 1083 | 4                    | 19          | 13          | 203         | 1           | 17         | 1           | 1                   | EPEC     |
| 245  | 4                    | 51          | 79          | 4           | 6           | 53         | 1           | 1                   | EPEC     |
| 1089 | 5                    | 1           | 4           | 3           | 2           | 4          | 4           | 1                   | STEC     |
| 1096 | 5                    | 5           | 5           | 2           | 1           | 5          | 95          | 1                   | STEC     |
| 1095 | 5                    | 5           | 5           | 2           | 3           | 5          | 1           | 1                   | STEC     |
| 1084 | 7                    | 121         | 2           | 4           | 1           | 5          | 8           | 1                   | EPEC     |
| 1093 | 20                   | 19          | 13          | 4           | 1           | 12         | 202         | 1                   | EPEC     |
| 1087 | 20                   | 37          | 1           | 15          | 1           | 1          | 1           | 1                   | EPEC     |
| 1092 | 164                  | 2           | 29          | 200         | 19          | 20         | 202         | 1                   | STEC     |
| 1082 | 172                  | 19          | 13          | 203         | 1           | 17         | 1           | 1                   | EPEC     |

El análisis eBurst reveló ocho grupos clonales que agrupaban 21 de los 24 ST detectados (46 de 52 cepas analizadas por este método). En siete de ellos no se pudo establecer un ST central y estaban constituidos por dos ST (cinco grupos) y tres ST (dos grupos); en el que sí se pudo, el ST central es ST 1090, con ST 89, ST 1091 y ST 1095 como diferentes en un locus del tipo central y ST 1096 como diferente en dos locus del tipo central (figura III.8). Los tres ST restantes se consideraron *singletons*. El gráfico representado en la figura III.9, realizado con SplitsTree, muestra las distancias relativas entre los distintos perfiles alélicos.

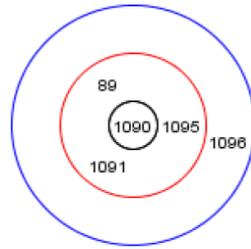


Figura III.8. Representación gráfica del análisis eBurst para siete genes del principal grupo clonal encontrado entre las cepas de *E. coli* estudiadas.

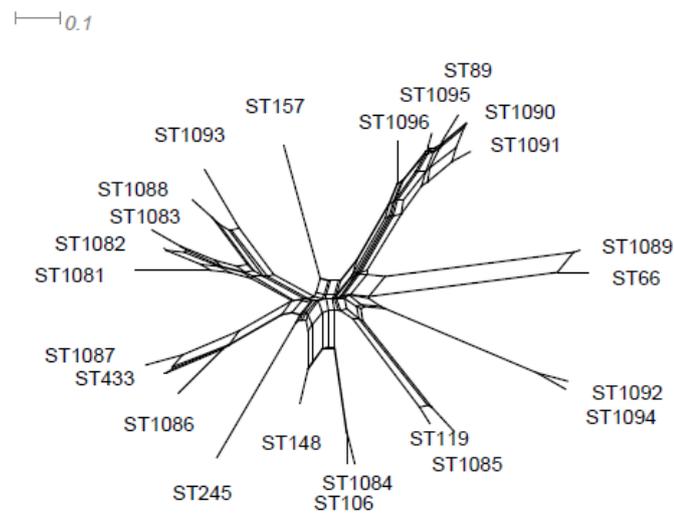


Figura III.9. Árbol representativo de las distancias relativas entre los distintos perfiles alélicos obtenidos tras analizar siete genes en las cepas de *E. coli* estudiadas.

El análisis filogenético de las secuencias concatenadas de los siete genes realizado con MEGA muestra una agrupación de ST similar a la obtenida con SplitsTree, con valores altos de *bootstrapping*, lo que indica que el ordenamiento filogenético es muy estable (figura III.10).



Tabla III.9. Resumen del análisis MLST de 38 cepas de *E. coli* atendiendo a ocho genes *housekeeping*.

| ST | Nº alelo de cada gen |             |             |             |             |            |             |             | Frecuencia |
|----|----------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|-------------|-------------|------------|
|    | <i>arcA</i>          | <i>cyaA</i> | <i>fadD</i> | <i>icdA</i> | <i>lysP</i> | <i>mdh</i> | <i>mtlD</i> | <i>rpoS</i> |            |
| 11 | 9                    | 3           | 2           | 4           | 1           | 5          | 13          | 1           | 11         |
| 8  | 8                    | 2           | 1           | 15          | 1           | 1          | 2           | 1           | 8          |
| 4  | 3                    | 3           | 20          | 23          | 1           | 29         | 31          | 1           | 5          |
| 1  | 3                    | 3           | 2           | 2           | 1           | 2          | 4           | 1           | 4          |
| 9  | 8                    | 3           | 2           | 4           | 1           | 5          | 13          | 1           | 2          |
| 12 | 9                    | 2           | 1           | 1           | 1           | 1          | 41          | 1           | 2          |
| 7  | 3                    | 3           | 2           | 2           | 1           | 3          | 3           | 1           | 1          |
| 5  | 3                    | 3           | 13          | 203         | 1           | 17         | 13          | 1           | 1          |
| 3  | 3                    | 3           | 13          | 203         | 1           | 17         | 13          | 69          | 1          |
| 2  | 3                    | 11          | 13          | 39          | 1           | 17         | 43          | 1           | 1          |
| 6  | 4                    | 2           | 1           | 1           | 1           | 1          | 41          | 1           | 1          |
| 10 | 9                    | 2           | 79          | 4           | 6           | 53         | 2           | 1           | 1          |

El análisis eBurst reveló cuatro grupos clonales que agrupaban ocho de los 12 ST detectados (23 de 38 cepas analizadas por este método), todos constituidos por dos ST. Los cuatro ST restantes se consideraron *singletons*. El gráfico representado en la figura III.11, realizado con SplitsTree, muestra las distancias relativas entre los distintos perfiles alélicos.

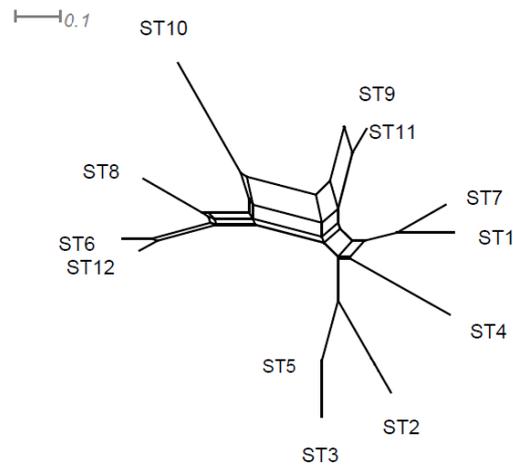


Figura III.11. Árbol representativo de las distancias relativas entre los distintos perfiles alélicos obtenidos tras analizar ocho genes MLST en cepas EPEC.

El análisis filogenético de las secuencias concatenadas de los ocho genes realizado con MEGA muestra una agrupación de ST similar a la obtenida con SplitsTree, con valores altos de *bootstrapping*, lo que indica que el ordenamiento filogenético es muy estable (figura III.12).

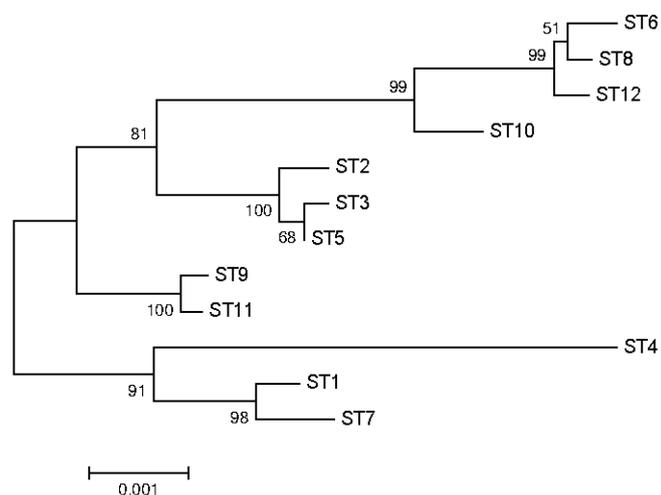


Figura III.12. Análisis filogenético de las secuencias concatenadas de los ocho genes MLST estudiados en cepas de EPEC.

En el análisis de las 27 cepas STEC se obtuvieron ocho ST distintos, siendo el más frecuente el ST 2 (11 cepas, 40,74 %) que incluye muestras de leche de cabra, pienso, heces de cabra en suelo y muestras aisladas de pacientes clínicos (tabla III.10).

Tabla III.10. Resumen del análisis MLST de 27 cepas de *E. coli* atendiendo a cinco genes *housekeeping*.

| ST | Nº alelo de cada gen |             |             |            |             | Frecuencia |
|----|----------------------|-------------|-------------|------------|-------------|------------|
|    | <i>arcA</i>          | <i>cyaA</i> | <i>fadD</i> | <i>mdh</i> | <i>mtlD</i> |            |
| 2  | 3                    | 3           | 5           | 5          | 3           | 11         |
| 3  | 6                    | 1           | 4           | 4          | 11          | 4          |
| 7  | 30                   | 38          | 29          | 20         | 46          | 4          |
| 1  | 3                    | 3           | 13          | 12         | 13          | 2          |
| 4  | 9                    | 3           | 2           | 5          | 13          | 2          |
| 6  | 29                   | 37          | 29          | 20         | 2           | 2          |
| 8  | 6                    | 1           | 4           | 4          | 2           | 1          |
| 5  | 17                   | 3           | 2           | 5          | 3           | 1          |

El análisis eBurst reveló dos grupos clonales que agrupaban cinco de los ocho ST detectados (19 de 27 cepas analizadas por este método). Un grupo clonal incluye dos ST y el otro tres ST. Los tres ST restantes se consideraron *singletons*. El gráfico representado en la figura III.13, realizado con SplitsTree, muestra las distancias relativas entre los distintos perfiles alélicos.

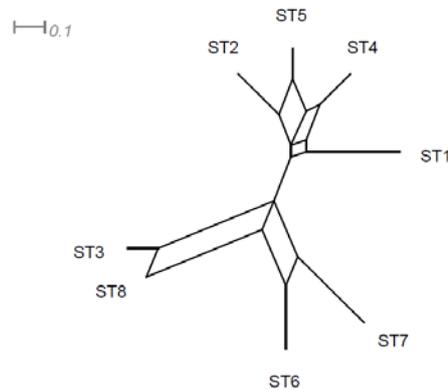


Figura III.13. Árbol representativo de las distancias relativas entre los distintos perfiles alélicos obtenidos tras analizar cinco genes MLST en cepas STEC.

El análisis filogenético de las secuencias concatenadas de los cinco genes realizado con MEGA muestra una agrupación de ST similar a la obtenida con SplitsTree, con valores altos de *bootstrapping*, lo que indica que el ordenamiento filogenético es muy estable (figura III.14).

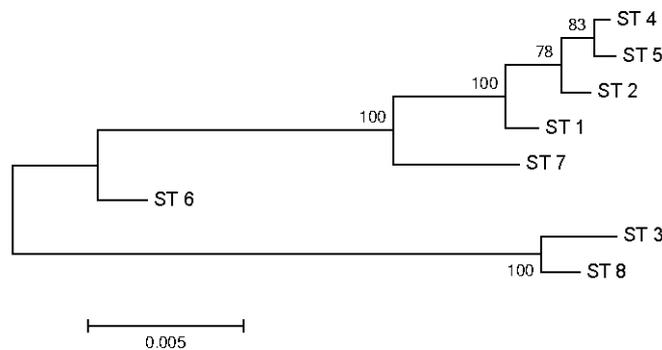


Figura III.14. Análisis filogenético de las secuencias concatenadas de los cinco genes MLST estudiados en cepas de STEC.

---

## **6.- Dry SPOT *E. coli* O157 latex test.**

Empleando este test comercial para detectar las cepas O157 mediante aglutinación de partículas de látex se comprobó que 5 cepas de las 55 aisladas (9,09 %) de muestras de explotación caprina resultaron positivas en esta prueba. Las cepas identificadas como O157 fueron L22EAS, P24EAS, P27EAS, H22cEAS y H24bEAS, y como era de esperar todas ellas se corresponden con cepas STEC identificadas mediante la detección de las toxinas Shiga tras el aislamiento.

## **7.- Serotipado.**

El resultado de la serotipificación de las cepas reveló que en muestras procedentes de explotaciones caprinas, la mayoría se corresponden con serotipos no patógenos, pero una de las cepas caracterizada como EPEC (H20EAS, procedente de una muestra de heces en suelo) se corresponde con el serotipo O26:H11, generalmente asociado a SUH. Este mismo serotipo se detectó en una cepa STEC aislada de pacientes con gastroenteritis. Como habíamos previamente observado con la técnica del DrySpot O157, cinco de las cepas aisladas de explotaciones caprinas se corresponden con el serotipo O157:H7 (tablas III.11 y III.12).

Tabla III.11. Relación de serotipos asignados a cada cepa EPEC.

|      | Cepa          | Origen         | Serotipo | Ag "O" | Titulo | Ag"H" | Movilidad |
|------|---------------|----------------|----------|--------|--------|-------|-----------|
| EPEC | L6EAS         | Leche de cabra | O76:H25  | 76     | 320    | [H25] | 0         |
|      | L29aEAS       | Leche de cabra | O102:H11 | 102    | 80     | H11   | 1         |
|      | L29bEAS       | Leche de cabra | O102:H11 | 102    | 80     | H11   | 1         |
|      | L36EAS        | Leche de cabra | O177:H11 | 177    | 320    | H11   | 1         |
|      | L37aEAS       | Leche de cabra | ONT:H25  | 0      |        | [H25] | 0         |
|      | L37bEAS       | Leche de cabra | ONT:H25  | 0      |        | H25   | 1         |
|      | L42bEAS       | Leche de cabra | O102:H11 | 102    | 80     | H11   | 1         |
|      | L50EAS        | Leche de cabra | ONT:HNT  | 0      |        | HNT   | 1         |
|      | L53EAS        | Leche de cabra | O103:H2  | 103    | 1280   | H2    | 1         |
|      | P36EAS        | Pienso         | O177:H7  | 177    | 320    | H7    | 1         |
|      | P41EAS        | Pienso         | ONT:H25  | 0      |        | [H25] | 0         |
|      | P46EAS        | Pienso         | O180:H2  | 180    | 640    | [H2]  | 0         |
|      | H20EAS        | Heces de cabra | O26:H11  | O26    | 320    | [H11] | 0         |
|      | H24aEAS       | Heces de cabra | O5:H2    | 5      | 320    | H2    | 1         |
|      | H25aEAS       | Heces de cabra | O3:HNM   | 3      | 320    | HNM   | 0         |
|      | H25bEAS       | Heces de cabra | O3:HNM   | 3      | 160    | HNM   | 0         |
|      | H26cEAS       | Heces de cabra | O5:HNM   | 5      | 320    | HNM   | 0         |
|      | H32EAS        | Heces de cabra | O177:H11 | 177    | 160    | H11   | 1         |
|      | H32bEAS       | Heces de cabra | ONT:HNM  | 0      |        | HNM   | 0         |
|      | H35EAS        | Heces de cabra | O102:H11 | 102    | 80     | [H11] | 0         |
|      | H36EAS        | Heces de cabra | O177:H11 | 177    | 320    | H11   | 1         |
|      | H39EAS        | Heces de cabra | ONT:H45  | 0      |        | H45   | 1         |
|      | H44EAS        | Heces de cabra | O146:H21 | 146    | 1280   | H21   | 1         |
|      | H46EAS        | Heces de cabra | ONT:H21  | 0      |        | H21   | 1         |
|      | H48EAS        | Heces de cabra | ONT:HNM  | 0      |        | HNM   | 0         |
|      | H50EAS        | Heces de cabra | ONT:HNT  | 0      |        | HNT   | 1         |
|      | H53EAS        | Heces de cabra | O103:H2  | 103    | 1280   | H2    | 1         |
|      | H54EAS        | Heces de cabra | O4:H2    | 4      | 1280   | H2    | 1         |
|      | H62EAS        | Heces de cabra | O5:H10   | 5      | 640    | H10   | 1         |
|      | H66EAS        | Heces de cabra | ONT:H10  | aa     |        | [H10] | 0         |
|      | C22           | Heces humanas  | O51:HNT  | 51     | 320    | HNT   | 1         |
|      | C147          | Heces humanas  | ONT:HNT  | 0      |        | HNT   | 1         |
| C156 | Heces humanas | O66:H21        | 66       | 160    | H21    | 1     |           |
| C171 | Heces humanas | O115:H10       | 115      | 2560   | [H10]  | 0     |           |
| C198 | Heces humanas | O115:H10       | 115      | 2560   | [H10]  | 0     |           |
| C212 | Heces humanas | O115:H10       | 115      | 1280   | [H10]  | 0     |           |
| C289 | Heces humanas | O35:H26        | 35       | 320    | H26    | 1     |           |
| C294 | Heces humanas | O85:H40        | 85       | 160    | H40    | 1     |           |
| C322 | Heces humanas | O177:H11       | 177      | 320    | [H11]  | 0     |           |

Tabla III.12. Relación de serotipos asignados a cada cepa STEC.

|      | Cepa    | Origen         | Serotipo | Ag "O" | Título | Ag"H" | Movilidad |
|------|---------|----------------|----------|--------|--------|-------|-----------|
| STEC | L10EAS  | Leche de cabra | O5:HNM   | 5      | 1280   | HNM   | 0         |
|      | L22EAS  | Leche de cabra | O157:H7  | 157    | 640    | H7    | 1         |
|      | L24aEAS | Leche de cabra | O146:H21 | 146    | 1280   | H21   | 1         |
|      | L24bEAS | Leche de cabra | O146:H21 | 146    | 1280   | [H21] | 0         |
|      | L26EAS  | Leche de cabra | O146:H21 | 146    | 1280   | [H21] | 0         |
|      | L27aEAS | Leche de cabra | O146:H21 | 146    | 1280   | H21   | 1         |
|      | L27bEAS | Leche de cabra | O146:H21 | 146    | 1280   | H21   | 1         |
|      | L31EAS  | Leche de cabra | O146:H21 | 146    | 1280   | H21   | 1         |
|      | L42aEAS | Leche de cabra | O102:H11 | 102    | 80     | H11   | 1         |
|      | P21EAS  | Pienso         | O146:H21 | 146    | 1280   | H21   | 1         |
|      | P24EAS  | Pienso         | O157:H7  | 157    | 320    | H7    | 1         |
|      | P25EAS  | Pienso         | O166:H28 | 166    | 320    | H28   | 1         |
|      | P27EAS  | Pienso         | O157:H7  | 157    | 320    | H7    | 1         |
|      | W20EAS  | Agua           | O5:HNM   | 5      | 640    | HNM   | 0         |
|      | W25EAS  | Agua           | O166:H28 | 166    | 320    | H28   | 1         |
|      | H22aEAS | Heces de cabra | O146:H21 | 146    | 1280   | H21   | 1         |
|      | H22bEAS | Heces de cabra | ONT:H4   | 0      |        | [H4]  | 0         |
|      | H22cEAS | Heces de cabra | O157:H7  | 157    | 320    | H7    | 1         |
|      | H24bEAS | Heces de cabra | O157:H7  | 157    | 320    | H7    | 1         |
|      | H25cEAS | Heces de cabra | ONT:HNT  |        |        | HNT   | 1         |
|      | H26aEAS | Heces de cabra | ONT:H28  | 0      |        | [H28] | 0         |
|      | H26bEAS | Heces de cabra | O166:H28 | 166    | 320    | H28   | 1         |
|      | H33EAS  | Heces de cabra | O106:H16 | 106    | 640    | H16   | 1         |
|      | H51EAS  | Heces de cabra | O146:H21 | 146    | 1280   | H21   | 1         |
|      | H60EAS  | Heces de cabra | ONT:H21  | 0      |        | [H21] | 0         |
|      | C59     | Heces humanas  | O146:H21 | 146    | 1280   | H21   | 1         |
|      | C65     | Heces humanas  | O26:H11  | O26    | 320    | H11   | 1         |
|      | C74     | Heces humanas  | ONT:H4   | 0      |        | [H4]  | 0         |
|      | C180    | Heces humanas  | O98:HNM  | 98     | 160    | HNM   | 0         |

## 8.- Metabolismo de carbohidratos.

Mediante el empleo del sistema estandarizado para el estudio del metabolismo de carbohidratos API 50 CH se comprobó la utilización de cada azúcar por las distintas cepas EPEC aisladas tanto de explotaciones caprinas (30 cepas) como de pacientes con gastroenteritis (nueve cepas). Atendiendo al resultado obtenido para cada una, tras tratar los datos estadísticamente, se obtuvo el dendrograma que se muestra en la

figura III.15 y que correlaciona las distintas cepas estudiadas utilizando el método de concordancia simple.

Todas las cepas analizadas metabolizan RIB, DXYL, GAL, GLU, FRU, MNE, MAN, NAG, MAL, LAC, MEL, TRE, LFUC, y GNT, y ninguna metaboliza ERI, LXYL, ADO, MDX, INO, MDM, AMY, INU, MLZ, AMD, GLYG, XLT, TUR, DUFC, DARL, LARL, 2KG (véase Tabla III.5).

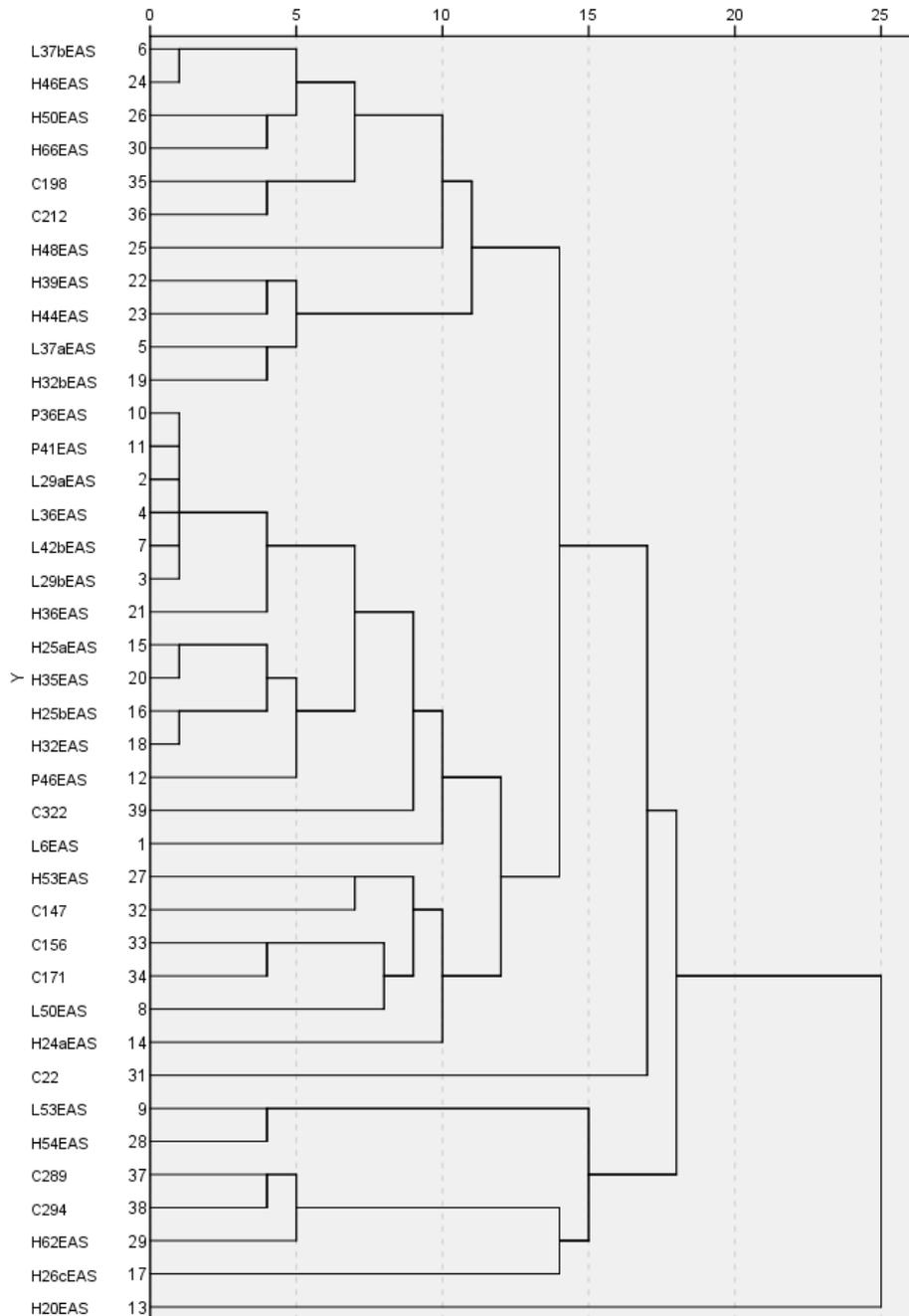


Figura III.15. Correlación existente entre las cepas EPEC y STEC estudiadas atendiendo a la utilización de carbohidratos.

---

## DISCUSIÓN.

Las cepas de *E. coli* STEC son agentes de infecciones en humanos debido a la ingesta de alimentos y agua contaminados con ellas y también por el contacto con animales infectados. El ganado vacuno y los pequeños rumiantes se consideran el principal reservorio de STEC porque estas bacterias pueden formar parte de su flora intestinal pudiendo, sus heces, suponer una fuente de contaminación tanto para la carne como para la leche y el agua.

La prevalencia de EPEC varía en relación con el área geográfica, los grupos de edad, los criterios de diagnóstico y los métodos utilizados para llevarlo a cabo. En países en vías de desarrollo, este patotipo es el responsable de un 5-10 % de las diarreas pediátricas. Estudios recientes sugieren que las cepas EPEC atípicas son más frecuentes que las típicas tanto en países desarrollados como en países en vías de desarrollo (Ochoa et al., 2008; Ochoa et al., 2009; Trabulsi et al., 2002).

Las nueve cepas clínicas no productoras de toxinas Shiga que poseían el gen *eae* consideramos que pertenecen al patotipo EPEC y la ausencia del gen *bfpA* nos indica que pueden corresponder al subtipo atípico (Trabulsi et al., 2002). Su perfil fenotípico permitió adscribirlas a género y la única diferencia entre ellas era que cinco fermentaban el sorbitol y cuatro eran sorbitol negativas al cultivarlas en placas de SMAC.

En cuanto a las cepas aisladas de explotaciones caprinas tampoco se detectó el gen *bfpA* mediante PCR, pese a que sí se observó la presencia de ADN plasmídico. Es importante tener presente que algunos autores consideran que pudiera haber cepas EPEC de origen no humano portadoras del gen *bfpA* pero que no es posible detectarlas con los cebadores empleados, ya que han sido diseñados basándose en la secuencia de cepas de origen humano, como sugirieron Carneiro et al. (2006), quienes únicamente detectaron dicho gen en cepas aisladas de muestras de leche mediante hibridación del ADN y no mediante PCR. La realización de pruebas de adherencia a líneas celulares sería una forma de resolver esta duda, pero quedaba fuera del alcance de este trabajo.

La búsqueda de otros genes de virulencia en las cepas EPEC atípicas aisladas de explotaciones caprinas reveló la presencia de los genes *tir*, *espA* y *espB* en alguna de sus variantes ( $\alpha$ ,  $\beta$  o  $\gamma$ ), asociados a la isla de patogenicidad LEE, responsables, junto con el gen *eae*, presente en todas ellas, de las lesiones de adhesión y borrado características de EPEC. Esto las diferencia de las halladas en estudios anteriores donde para cada aislado solo se detectaba una variante de cada gen (Carneiro et al., 2006; China et al., 1999). En nuestro caso, algunas cepas presentaban hasta dos variantes. Creemos que esto puede deberse a inespecificidades de los cebadores ya que fueron diseñados para la detección de regiones variables en cepas procedentes de muestras clínicas.

La mayor parte de las cepas de *E. coli* tienen capacidad para fermentar la lactosa y otros azúcares como D-manitol, D-sorbitol, L-arabinosa, maltosa, D-xilosa, trehalosa y D-manosa (Meng et al., 2001)(Meng et al., 2001)(Meng et al., 2001)(Meng et al., 2001)(Meng et al., 2001). El empleo del sorbitol ha servido durante mucho tiempo para diferenciar las cepas de *E. coli* productoras de Stxs pertenecientes al serotipo O157:H7, responsables de numerosos casos de CH y SUH, de otras cepas de *E. coli* productoras de toxinas shiga (Karch & Bielaszewska, 2001; March & Ratnam, 1986). Las cepas O157:H7 no fermentan el sorbitol, carecen de actividad  $\beta$ -glucuronidasa y son más resistentes a cefixima y telurito. Basándose en estas propiedades se han desarrollado medios de cultivo como el *Sorbitol MacConkey Agar* (SMAC) que han facilitado su aislamiento. Sin embargo, el empleo de un medio selectivo que contenga sorbitol no debe considerarse una forma definitiva de diagnóstico ya que no todas las cepas sorbitol negativo son *E. coli* O157:H7, y hay cuadros de SUH producidos por cepas no-O157:H7 que fermentan el sorbitol (Ammon et al., 1999).

La utilidad del sorbitol en el medio de aislamiento para diferenciar las cepas O157 sugiere que la incorporación de ciertos azúcares a algunos medios generales podrían ser empleados para detectar otros serotipos patógenos, sobre todo entre las cepas EPEC, que han sido menos estudiadas y están siendo consideradas como patógenos emergentes. El empleo del sistema miniaturizado API 50 CH que incluye 50 azúcares, nos permitió observar de manera sencilla el perfil de los aislados EPEC, tanto

---

de las cepas obtenidas de muestras clínicas como de las procedentes de explotaciones caprinas. Como ya se ha señalado, estos datos podrían ser empleados para el diseño de medios de cultivo útiles para la detección y aislamiento de cepas EPEC.

La determinación de los grupos filogenéticos se realizó sustituyendo los métodos de referencia más complejos y tediosos (ribotipado y electroforesis de enzimas multilocus) por el método descrito por Clermont et al. (2000) que propone una clasificación en 4 grupos filogenéticos (A, B1, B2 y D). La asignación de aislados de *E. coli* a los distintos grupos filogenéticos empleando el sistema de la PCR triple ha sido muy utilizado dado que es un método sencillo y barato que además ha proporcionado diferencias adicionales en cuanto a que las cepas de los diversos grupos filogenéticos difieren en sus características fenotípicas y genotípicas, su nicho ecológico, y su capacidad de causar enfermedad (Clermont et al., 2013). Algunos autores sugieren que existe una mayor prevalencia del grupo B1 en animales herbívoros y del grupo A en animales carnívoros y omnívoros (Baldy-Chudzik et al., 2008), dato que hemos comprobado tras analizar nuestras muestras. Tanto en muestras clínicas como en las muestras de explotaciones caprinas hemos detectado la presencia de los cuatro grupos filogenéticos, pero se distribuyen de manera distinta. En muestras clínicas el 46,16 % (seis aislados) corresponden al grupo filogenético A, el 38,46 % (cinco aislados) al grupo B1, el 7,69 % (uno aislado) al grupo B2 y el 7,69 % (uno aislado) al grupo D, sin embargo en muestras de explotaciones caprinas el 20,37 % (11 aislados) corresponden al grupo A, el 61,11 % (33 aislados) al grupo B1, el 7,41 % (cuatro aislados) al grupo B2 y el 11,11 % (sies aislados) al grupo D. Resultados similares obtienen Alizade et al. (2014) tras comparar aislados de muestras de pacientes con diarrea y muestras de heces de ganado sano.

Teniendo en cuenta que según Clermont et al. (2000) las principales cepas virulentas extra-intestinales se incluyen dentro de los grupos B2 y D, mientras que las cepas comensales pertenecerían a los grupos A y B1, sobre el total de nuestras muestras analizadas, el 18 % (10 aislados) pertenecen a los grupos patógenos, y el resto (82 %) se trataría de bacterias del grupo “comensales”. En este estudio, todas las cepas aisladas pertenecientes al serotipo O157:H7 se incluyeron dentro del grupo D,

como ya se había observado en estudios anteriores (Bidet et al., 2005; Carlos et al., 2010).

Gordon et al. (2008), mediante el análisis de datos MLST, llevaron a cabo una validación del método de la PCR triple para asignar las cepas de *E. coli* a los distintos grupos filogenéticos y demostraron que el 80-85 % de las asignaciones son correctas. Sin embargo, también demostró que una fracción significativa de cepas con genotipos particulares (A, D1, D2) se asignan incorrectamente. Por ello, Clermont et al. (2013) realizaron una revisión posterior de la técnica con el fin de mejorar la asignación a los distintos grupos filogenéticos. Las características de la nueva técnica incluyen otros cebadores para amplificar los tres genes diana investigados anteriormente y se incorpora la búsqueda de un nuevo gen *arpA*, con el fin de diferenciar entre ocho grupos filogenéticos distintos. Sin embargo, comprobaron que no es muy necesario repetir para las cepas asignadas a los grupos B1 y B2 identificadas mediante la técnica antigua, ya que no se han observado diferencias al aplicar los nuevos cebadores. No obstante, habría que reasignar las cepas incluidas anteriormente en los grupos A y D. Aun así, las mejoras introducidas en la técnica para la asignación de las cepas a los distintos grupos filogenéticos continúa sin resolver el problema de que algunas cepas no se puedan asignar a ningún grupo (Clermont et al., 2013).

El análisis de los datos de PFGE demostró una gran heterogeneidad de las cepas. Éstas se pudieron agrupar en 13 *clusters* distintos; tres de ellos incluyen cepas tanto de origen humano como de explotaciones caprinas, lo que sugiere que existía relación entre ellas. Otero et al. (2013) hallaron resultados similares al comparar cepas EPEC aisladas de muestras de explotaciones ovinas y de muestras clínicas.

También observamos que un *cluster* agrupaba cepas tanto EPEC como STEC, y que los *clusters* constituídos únicamente por cepas EPEC o STEC estaban bastante relacionados entre sí, lo que apoya la teoría de la posible la relación entre ambos patotipos que ya ha sido sugerida por algunos autores como Trabulsi et al. (2002). Éstos señalaron que las cepas de EPEC atípicas, generalmente relacionadas con reservorios animales, estaban estrechamente relacionadas con cepas STEC en

---

características genéticas, serotipos, producción de toxinas, reservorio y otros factores epidemiológicos.

El análisis MLST de siete genes recomendado por EcMLST (*aspC*, *clpX*, *fadD*, *icdA*, *lysP*, *mdh*, y *uidA*) reveló la existencia de 24 perfiles que agrupaban a las 54 cepas de *E. coli* aisladas de leche o de muestras tomadas en explotaciones caprinas. La identificación de nuevos alelos, así como de 16 nuevos perfiles corrobora la gran heterogeneidad filogenética observada también mediante PFGE. Además, el perfil de alelos más frecuente incluía cepas tanto EPEC como STEC, corroborando nuevamente la relación entre ambos patotipos ya observada mediante otras técnicas de caracterización molecular y en los estudios previos comentados.

Dado que existen pocos trabajos que relacionen las cepas de *E. coli* patógenas de origen animal con las obtenidas de infecciones causadas en humanos, se consideró interesante hacer un análisis comparando las cepas EPEC y STEC aisladas de leche de cabra o de muestras de explotaciones caprinas con cepas de origen clínico, utilizadas en estudios anteriores llevados a cabo en nuestro laboratorio (Otero et al., 2013). En el caso de las cepas EPEC, el análisis de 8 genes *housekeeping* recomendados por EcMLST reveló 12 perfiles alélicos, estando el perfil más frecuente constituido por cepas aisladas de heces humanas (clínicas) y otras obtenidas de leche de cabra, pienso y heces caprinas. El análisis de cinco genes *housekeeping* recomendados por EcMLST de las cepas STEC reveló ocho perfiles alélicos, incluyendo el perfil más frecuente, al igual que en el caso de las cepas EPEC, cepas aisladas de heces humanas (clínicas) y otras procedentes de leche de cabra, pienso y heces de cabra. Resultados similares obtuvieron otros autores (Moura et al., 2009; Otero et al., 2013) al comparar cepas EPEC de origen clínico con cepas aisladas de diferentes especies animales, a pesar de emplear perfiles genéticos no coincidentes totalmente con los utilizados en este trabajo.

Al analizar los serotipos que presentan las cepas EPEC clínicas, comprobamos que solo una de ellas (C322) presentaba un serotipo idéntico a uno de los identificados en cepas procedentes de muestras de leche de tanque (L36EAS) y de explotaciones caprinas (H32EAS y H36EAS). Se trataba del serotipo O177:H11. Este serotipo, descrito

recientemente como patógeno humano, se ha detectado frecuentemente en animales sanos y se ha asociado con los patotipos aEPEC (contiene *eae*) y EHEC (*eae* y *stx* positivo), además carece del plásmido EAF (Beutin et al., 2005). El resto de serotipos detectados en las cepas EPEC clínicas se asociaban hasta el momento con cepas típicamente comensales, pero dada su detección en muestras clínicas esto podría no ser así.

Entre las cepas aEPEC procedentes de explotaciones caprinas cabe destacar la presencia de dos cepas (P36EAS y H53EAS) del serotipo O103:H2, aisladas de dos muestras diferentes (pienso y heces), que ha causado numerosos casos de gastroenteritis y SUH en varios países Europeos y en los Estados Unidos (Eklund et al., 2001; Prager et al., 2002; Tarr et al., 1996) y de una cepa (H20EAS) del serotipo O26:H11, que se trata de un serotipo de los más prevalentes en los aislamientos procedentes de casos de CH y SUH en humanos (Blanco et al., 2003) también detectado en la cepa clínica STEC C65, pero no disponemos de datos sobre si los pacientes portadores de dicha cepa desarrollaron CH o SUH. El resto de los serotipos detectados en las cepas aisladas en muestras de explotaciones caprinas no han presentado hasta el momento ninguna relevancia a nivel clínico.

El serotipo O146:H21, correspondiente a la cepa clínica de STEC denominada C59, es típico de cepas de STEC humanas, aunque se aísla frecuentemente de cabras como se observa en nuestro estudio y en el realizado por Cortés et al. (2005) y también en ovejas como comprobaron Blanco et al. (2003). La cepa C59 posee el gen que codifica para la toxina Stx2, la cual, según ha sido sugerido por datos epidemiológicos, posee una importancia patogénica superior a la Stx1 en el desarrollo del SUH (Boyce et al., 1995). En este estudio, hemos encontrado otra cepa, adscrita a EPEC, con este serotipo. Se trata de la cepa H39EAS, que además se incluye en el grupo filogenético A de la clasificación de Clermont et al. (2000), mientras que el resto de cepas que presentan ese mismo serotipo (todas ellas adscritas a STEC) pertenecen al grupo B1.

En relación con los serotipos a los que pertenecían algunas de nuestras cepas STEC y EPEC, nuestros datos coinciden con los obtenidos por otros autores que sugieren que las cepas atípicas de EPEC están estrechamente relacionadas con cepas

---

de *E. coli* productoras de toxinas Shiga en lo referente a características genéticas, serotipos, producción de toxinas, reservorio y otros factores epidemiológicos y aunque sus mecanismos de patogenicidad no se conocen en su totalidad, las cepas aEPEC están emergiendo como patógenos en países desarrollados (Trabulsi et al., 2002). Un ejemplo de la versatilidad de las cepas patógenas de *E. coli* lo encontramos en la cepa que causó un importante brote en Alemania y en Francia en el año 2011, que se cree que ha emergido a partir de una cepa enteroagregativa del serotipo O104:H4 mediante la adquisición de un fago portador del gen *stx2a* presente en las cepas STEC. Por ello no se considera improbable que nuevas cepas patógenas puedan surgir debido a la presión selectiva que se ejerce sobre cepas que comparten hábitats.

Entre las cepas STEC patógenas hay que destacar las que presentan el serotipo O157:H7 por ser las más importantes dentro del grupo de patógenos emergentes en países desarrollados. Estas cepas se han visto implicadas en numerosos brotes clínicos con importantes síntomas, causando en los casos más graves la muerte del paciente, y se asocian frecuentemente al consumo de alimentos (EFSA, 2013). En nuestro estudio no se detectó ninguna muestra clínica con cepas de este serotipo, pero sí que se detectaron en muestras de leche de tanque (una cepa), de pienso (dos cepas) y de heces (dos cepas) procedentes de explotaciones de caprino. En identificación de este serotipo se obtuvieron resultados idénticos utilizando el test comercial DrySpot *E. coli* O157 (Oxoid) basado en la aglutinación del látex, que empleando sistemas convencionales. Los resultados obtenidos para este serotipo muestran una prevalencia de O157 elevada (9,09 %) respecto a datos hallados en la bibliografía, ya que en estudios previos realizados en España por Rey et al. (2006), la prevalencia de este serotipo era del 0,3 %.

El resto de serotipos detectados tanto en las cepas STEC clínicas como en las procedentes de explotaciones lecheras de caprino son similares a los encontrados en otros estudios realizados en ovejas (Blanco et al., 2003) y que también habían sido detectados en humanos, pero que no se han asociado con síntomas clínicos importantes.

## BIBLIOGRAFÍA.

- AESAN, 2012. 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/ productores de toxinas Shiga/ enterohemorrágicos (VTEC/ STEC/ EHEC). Revista del Comité Científico. 16, 71 - 100.
- Alizade, H., Ghanbarpour, R., Nekoubin, M., 2014. "Phylogenetic of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* and a typical Enteropathogenic *Escherichia coli* Strains Isolated From Human and Cattle in Kerman, Iran". International Journal of Enteric Pathogens. 1, e15195.
- Ammon, A., Petersen, L. R., Karch, H., 1999. "A large outbreak of hemolytic uremic syndrome caused by an unusual sorbitol-fermenting strain of *Escherichia coli* O157:H-". Journal of Infectious Diseases. 179, 1274-1277.
- Baldy-Chudzik, K., Mackiewicz, P., Stosik, M., 2008. "Phylogenetic background, virulence gene profiles, and genomic diversity in commensal *Escherichia coli* isolated from ten mammal species living in one zoo". Veterinary Microbiology. 131, 173-184.
- Beutin, L., Kong, Q., Feng, L., Wang, Q., Krause, G., Leomil, L., Jin, Q., Wang, L., 2005. "Development of PCR assays targeting the genes involved in synthesis and assembly of the new *Escherichia coli* O174 and O177 O antigens". Journal of Clinical Microbiology. 43, 5143-5149.
- Bidet, P., Mariani-Kurkdjian, P., Grimont, F., Brahimi, N., Courroux, C., Grimont, P., Bingen, E., 2005. "Characterization of *Escherichia coli* O157 : H7 isolates causing haemolytic uraemic syndrome in France". Journal of Medical Microbiology. 54, 71-75.

- 
- Blanco, J., 2012. *Escherichia coli* enteroagregativa O104: H4-ST678 productora de Stx2a. ¡Diagnóstico microbiológico ya, de este y otros serotipos de STEC/VTEC! Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 30, 84-89.
- Blanco, M., Blanco, J., Mora, A., Rey, J., Alonso, J., Hermoso, M., Hermoso, J., Alonso, M., Dahbi, G., González, E., 2003. "Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from healthy sheep in Spain". Journal of Clinical Microbiology. 41, 1351-1356.
- Boyce, T. G., Swerdlow, D. L., Griffin, P. M., 1995. "*Escherichia coli* O157: H7 and the hemolytic – uremic syndrome". New England Journal of Medicine. 333, 364-368.
- Carlos, C., Pires, M. M., Stoppe, N. C., Hachich, E. M., Sato, M. I., Gomes, T. A., Amaral, L. A., Ottoboni, L.M., 2010. "*Escherichia coli* phylogenetic group determination and its application in the identification of the major animal source of fecal contamination". BMC Microbiology. 10, 161-2180-10-161.
- Carneiro, L., Lins, M., Garcia, F., Silva, A., Mauller, P., Alves, G., Rosa, A., Andrade, J., Freitas-Almeida, A., Queiroz, M., 2006. "Phenotypic and genotypic characterisation of *Escherichia coli* strains serogrouped as enteropathogenic *E. coli* (EPEC) isolated from pasteurised milk". International Journal of Food Microbiology. 108, 15-21.
- China, B., Goffaux, F., Pirson, V., Mainil, J., 1999. "Comparison of *eae*, *tir*, *espA* and *espB* genes of bovine and human attaching and effacing *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction". FEMS Microbiology Letters. 178, 177-182.
- Clermont, O., Bonacorsi, S., Bingen, E., 2000. "Rapid and Simple Determination of the *Escherichia coli* Phylogenetic Group". Applied and Environmental Microbiology. 66, 4555-4558.

- Clermont, O., Christenson, J. K., Denamur, E., Gordon, D. M., 2013. "The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups". *Environmental Microbiology Reports*. 5, 58-65.
- Comisión Europea, 2005. REGLAMENTO (CE) No 2073/2005 DE LA COMISIÓN de 15 de noviembre de 2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. (DO L 338 de 22.12.2005, p. 1).
- Cortés, C., De la Fuente, R., Blanco, J., Blanco, M., Blanco, J. E., Dhabi, G., Mora, A., Justel, P., Contreras, A., Sanchez, A., Corrales, J. C., Orden, J. A., 2005. "Serotypes, virulence genes and intimin types of verotoxin-producing *Escherichia coli* and enteropathogenic *E. coli* isolated from healthy dairy goats in Spain". *Veterinary Microbiology*. 110, 67-76.
- Díez, M. G., Meindl, K., Frässdorf, J., Wolf, S., Schalch, B., Busch, U., 2009. "Prevalence of enteropathogenic *Escherichia coli* in food and water in Bavaria in 2007". *Archiv für Lebensmittelhygiene*. 60 (2), 77-81.
- EFSA, 2014. "The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012". *EFSA Journal*. 12 (2), 3547.
- EFSA, 2013. "The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2011". *EFSA Journal*. 11(4):3129
- Eklund, M., Scheutz, F., Siitonen, A., 2001. "Clinical isolates of non-O157 shiga toxin-producing *Escherichia coli*: serotypes, virulence characteristics, and molecular profiles of strains of the same serotype". *Journal of Clinical Microbiology*. 39, 2829-2834.
- Elizaquível P., Sánchez G., Aznar R., 2011. "*Escherichia*". En Dongyou Liu (Ed.), "Molecular detection of human bacterial pathogens". CRC Press, Taylor and Francis Group. pp. 869.

- 
- Frank, C., Werber, D., Cramer, J. P., Askar, M., Faber, M., an der Heiden, M., Bernard, H., Fruth, A., Prager, R., Spode, A., 2011. "Epidemic profile of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* O104: H4 outbreak in Germany". *New England Journal of Medicine*. 365, 1771-1780.
- Garrity, G., Brenner, D.J., Krieg, N.R., Staley, J.T., 2005. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Springer, New York, EE.UU.
- Gordon, D. M., Clermont, O., Tolley, H., Denamur, E., 2008. "Assigning *Escherichia coli* strains to phylogenetic groups: multi-locus sequence typing versus the PCR triplex method". *Environmental Microbiology*. 10, 2484-2496.
- Gunzburg, S. T., Tornieporth, N. G., Riley, L. W., 1995. "Identification of enteropathogenic *Escherichia coli* by PCR-based detection of the bundle-forming pilus gene". *Journal of Clinical Microbiology*. 33, 1375-1377.
- Hanage, W. P., Feil, E. J., Brueggemann, A. B., Spratt, B. G., 2004. "Multilocus Sequence Typing: Strain Characterization, Population Biology, and Patterns of Evolutionary Descent". En D. H. Persing (Ed.), "Molecular Microbiology. Diagnostic Principles and Practice". ASM Press, Washington, DC., EE. UU., pp. 235-243.
- Hernandes, R. T., Elias, W. P., Vieira, M. A., Gomes, T. A., 2009. "An overview of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*". *FEMS Microbiology Letters*. 297, 137-149.
- Huson, D. H., Bryant, D., 2006. "Application of phylogenetic networks in evolutionary studies". *Molecular Biology and Evolution*. 23, 254-267.
- Jolley, K. A., Feil, E., Chan, M., Maiden, M. C. J., 2001. "Sequence type analysis and recombinational tests (START)". *Bioinformatics* 17, 1230-1231.
- Kaper, J. B., Nataro, J. P., Mobley, H. L. T., 2004. "Pathogenic *Escherichia coli*". *Nature Reviews Microbiology*. 2, 123-140.

- Karch, H., Bielaszewska, M., 2001. "Sorbitol-fermenting Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H(-) strains: epidemiology, phenotypic and molecular characteristics, and microbiological diagnosis". *Journal of Clinical Microbiology*. 39, 2043-2049.
- Karmali, M. A., Mascarenhas, M., Shen, S., Ziebell, K., Johnson, S., Reid-Smith, R., Isaac-Renton, J., Clark, C., Rahn, K., Kaper, J. B., 2003. "Association of genomic O island 122 of *Escherichia coli* EDL 933 with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* seropathotypes that are linked to epidemic and/or serious disease". *Journal of Clinical Microbiology*. 41, 4930-4940.
- March, S. B., Ratnam, S., 1986. "Sorbitol-MacConkey medium for detection of *Escherichia coli* O157:H7 associated with hemorrhagic colitis". *Journal of Clinical Microbiology*. 23, 869-872.
- Margall, N., Dominguez, A., Prats, G., Salleras, L., 1997. "Gastro-hemorrhagic *Escherichia coli*". *Revista Española de Salud Pública*. 71, 437-43.
- Meng, J., Feng, P., Doyle, M. P., 2001. "Pathogenic *Escherichia coli*". En F. Pouch Downes, K. Ito (Eds.), "Compendium of methods for the microbiological examination of foods". American Public Health Association, Washington, D.C., EE. UU., pp. 331-341.
- Moura, R. A., Sircili, M. P., Leomil, L., Matté, M. H., Trabulsi, L. R., Elias, W. P., Irino, K., de Castro, Antonio F Pestana, 2009. "Clonal relationship among atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from different animal species and humans". *Applied and Environmental Microbiology*. 75, 7399-7408.
- Nataro, J. P., Kaper, J. B., 1998. "Diarrheagenic *Escherichia coli*". *Clinical Microbiology Reviews*. 11, 142-201.
- Ochoa, T. J., Barletta, F., Contreras, C., Mercado, E., 2008. "New insights into the epidemiology of enteropathogenic *Escherichia coli* infection". *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 102, 852-856.

- 
- Ochoa, T. J., Ruiz, J., Molina, M., Del Valle, L. J., Vargas, M., Gil, A. I., Ecker, L., Barletta, F., Hall, E., Cleary, T. G., Lanata, C. F., 2009. "High frequency of antimicrobial drug resistance of diarrheagenic *Escherichia coli* in infants in Peru". American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 81, 296-301.
- Otero, V., Rodriguez-Calleja, J. M., Otero, A., García-López, M. L., Santos, J. A., 2013. "Genetic characterization of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* isolates from ewes' milk, sheep farm environments, and humans by multilocus sequence typing and pulsed-field gel electrophoresis". Applied and Environmental Microbiology.
- Paton, A. W., Paton, J. C., 1998. "Detection and characterization of Shiga toxicogenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli hlyA*, *rfbO111*, and *rfbO157*". Journal of Clinical Microbiology. 36, 598-602.
- Prager, R., Liesegang, A., Voigt, W., Rabsch, W., Fruth, A., Tschäpe, H., 2002. "Clonal diversity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O103:H2/H- in Germany". Infection, Genetics and Evolution. 1, 265-275.
- Rey, J., Sánchez, S., Blanco, J., Hermoso de Mendoza, J., Hermoso de Mendoza, M., García, A., Gil, C., Tejero, N., Rubio, R., Alonso, J., 2006. "Prevalence, serotypes and virulence genes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from ovine and caprine milk and other dairy products in Spain". International Journal of Food Microbiology. 107, 212-217.
- Ribot, E. M., Fair, M., Gautom, R., Cameron, D., Hunter, S., Swaminathan, B., Barrett, T. J., 2006. "Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet". Foodborne Pathogens and Disease. 3, 59-67.
- SIM, 2014. Informe anual del sistema de información microbiológica 2012. Instituto de Salud Carlos III.

SIM, 2003. Brotes de enfermedades transmitidas por alimentos. España 1994 - 2003. Instituto de Salud Carlos III.

Tarr, P. I., Fouser, L. S., Stapleton, A. E., Wilson, R. A., Kim, H. H., Vary Jr, J. C., Clausen, C. R., 1996. "Hemolytic-Uremic Syndrome in a Six-Year-Old Girl after a Urinary Tract Infection with Shiga-Toxin-Producing *Escherichia coli* O103:H2". New England Journal of Medicine. 335, 635-638.

Trabulsi, L. R., Keller, R., Tardelli Gomes, T. A., 2002. "Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*". Emerging Infectious Diseases. 8, 508-513.





**CAPÍTULO IV. PRUEBAS DE COMPORTAMIENTO DE  
CEPAS EPEC Y STEC EN LECHE DE CABRA Y  
PRODUCTOS DERIVADOS.**



## INTRODUCCIÓN.

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, en el año 2013, la producción mundial de leche alcanzó cerca 780 millones de toneladas, lo que supone un elevado consumo y comercio de productos lácteos (FAO, 2013). En este sentido, la inocuidad asociada al control y la prevención de los patógenos transmitidos por los alimentos de origen lácteo son de primordial importancia para la salud pública. Se sabe que los animales lecheros constituyen uno de los principales reservorios de microorganismos patógenos que se pueden transferir a la leche; entre ellos, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter* spp., patotipos de *E. coli* patógeno, y muchos otros agentes de zoonosis, y que la leche cruda supone un excelente medio de cultivo para el desarrollo de estos microorganismos si no se toman medidas que controlen su crecimiento (Farrokh et al., 2013).

### **Influencia de la temperatura en la proliferación de las bacterias en la leche.**

La temperatura influye de forma decisiva en la proliferación de las bacterias presentes en la leche. El frío disminuye la tasa de crecimiento de numerosos géneros y especies y por ello influye en los niveles de bacterias mesófilas tanto patógenas como alterantes. A medida que aumenta la temperatura se produce una aceleración del desarrollo microbiano, que es máximo, a las temperaturas en torno a los 35-40 °C. A partir de éstas también disminuyen o mueren, pero no son las mismas bacterias las que crecen a las distintas temperaturas. Este parámetro extrínseco ejerce un papel selectivo a la hora de favorecer el crecimiento de las bacterias, y esto se aprovecha en la industria láctea (Alais, 1985).

Con la refrigeración se consigue controlar la multiplicación de microorganismos mesófilos hasta el momento de su utilización o transformación, y es por ello que, según el Reglamento 853/2004, la leche deberá enfriarse inmediatamente después del ordeño a una temperatura no superior a 8 °C en el caso de recogida diaria, y no

---

superior a 6 °C si la recogida no se efectúa diariamente, y que durante el transporte deberá mantenerse la cadena de frío, y a la llegada al establecimiento de destino, la temperatura no deberá superar los 10 °C (Parlamento Europeo, 2004).

Por otro lado, el tratamiento de pasteurización, tanto HTST como LHT permite la eliminación de los microorganismos patógenos no esporulados y la mayor parte de la microbiota inocua. Esto es obligatorio para la leche cruda destinada a la fabricación de la mayoría de productos lácteos. La esterilización destruye todas las células y muchas esporas e inactiva las enzimas, pero no permite la conservación de todas las propiedades y cualidades originales de la leche, por ello la pasteurización supone una buena alternativa, ya que elimina los gérmenes patógenos para el hombre sin modificar de una forma tan significativa otros aspectos de composición, por lo que este tipo de leche es más apropiada para la elaboración de determinados derivados lácteos (Alais, 1985).

En el caso de *E. coli* se sabe que la mayoría de las cepas son capaces de crecer a temperaturas entre 10 y 46 °C, pero existen algunas cepas capaces de crecer a 8 °C. Sin embargo, algunos serotipos de STEC pueden crecer en leche a temperaturas tan bajas como 6,5 °C (Kauppi et al., 1996). Además, algunos componentes de la leche pueden ejercer un efecto protector frente a las bajas temperaturas; así el periodo de supervivencia de *E. coli* O157:H7 en leche aromatizada y desnatada contaminada artificialmente y mantenida a una temperatura de 4 °C queda reducido a la mitad respecto a la leche entera, sugiriendo un papel protector de la fracción grasa (Farrokh et al., 2013). Una publicación reciente también ha demostrado que algunas cepas de *E. coli* O157:H7 poseen mecanismos genéticos inherentes que permiten el crecimiento a temperaturas inferiores (<15 °C) a las de las cepas de *E. coli* no patógenas (Strawn & Danyluk, 2010; Vidovic et al., 2011) y también su supervivencia a temperaturas de congelación (-18 a -20 °C) (Farrokh et al., 2013; Strawn & Danyluk, 2010).

*E. coli* no presenta una inusual resistencia al calor en condiciones de pH neutro y actividad de agua moderadamente elevada, siendo inactivadas en la pasterización de la leche a 72 °C durante 15 segundos, por tanto su presencia en leche pasterizada se

debe a fallos en el tratamiento térmico o a contaminación post-tratamiento (Farrokh et al., 2013).

### **Influencia del pH en la proliferación de las bacterias en la leche.**

Las bacterias, al igual que todos los organismos vivos, necesitan un pH fisiológico en el interior de sus células. Su capacidad para sobrevivir en un pH extremo, ya sea más alto o más bajo, depende de su capacidad para corregir la diferencia entre su medio interno y el exterior y adaptarse con ello al nuevo entorno. Inicialmente el pH de la leche fresca recién ordeñada está en torno a 6,5 – 6,7, pero como la leche no es un alimento estéril y contiene microorganismos, si no se mantiene en las condiciones óptimas de almacenamiento para evitar la proliferación de éstos, puede ocurrir que se produzcan variaciones del pH que acaban modificando sus propiedades. Un ejemplo lo encontramos en la proliferación de las bacterias lácticas. Cuando éstas actúan, la lactosa se degrada y se transforma en ácido láctico, disminuyendo el pH por debajo de 6,5. Por el contrario, valores superiores a pH 7,0 indican que la leche presenta compuestos con características alcalinas, propios de leches mamáticas (Casado Cimiano & García Álvarez, 1986).

La mayoría de los brotes alimentarios producidos por *E. coli* O157:H7 se han relacionado con la ingesta de carne o leche cruda (pH más o menos neutro), pero en algunos casos se ha relacionado con productos más ácidos, como el brote producido en 1980 en Canadá (Steele et al., 1982) y el declarado en 1991 en Massachusetts (EE.UU.) (Zhao et al., 1993) dónde, en ambos casos, el vehículo de transmisión fue la sidra de manzana, un producto con pH entre 3,6 y 4,0, y otro brote ocurrido en 1991 asociado al consumo de yogurt (Morgan et al., 1993a). Estos brotes y los trabajos realizados por Zhao et al. (1993) sugieren que *E. coli* O157:H7 es capaz de tolerar condiciones ácidas. Además, otros estudios han demostrado que *E. coli* O157:H7 es capaz de crecer en productos lácteos fermentados y que es resistente a diversos ácidos orgánicos (Arocha et al., 1992; Conner & Kotrola, 1995).

---

## **Influencia de la actividad de agua en la proliferación de las bacterias en la leche.**

La gran mayoría de las bacterias requieren unos valores de actividad de agua ( $a_w$ ) altos para poder crecer. Cuando una bacteria se encuentra en un sustrato con una  $a_w$  baja, su crecimiento se detiene. Esta detención del crecimiento no suele llevar asociada la muerte del microorganismo, sino que éste se mantiene en condiciones de resistencia durante un tiempo más o menos largo. Existen bacterias extremadamente tolerantes a actividades muy bajas (toleran valores de  $a_w = 0,60$ ), como es el caso del grupo de las arqueobacterias, pero la mayoría de las bacterias necesitan valores superiores a 0,90. La reducción de la actividad de agua para limitar el crecimiento bacteriano tiene importancia aplicada en la industria alimentaria. La utilización de almíbares, salmueras, desecación o congelación, reduce la actividad de agua del alimento para controlar el crecimiento bacteriano.

La  $a_w$  mínima necesaria para el crecimiento de *E. coli* es de 0,945 – 0,950, por lo que éste no será un factor limitante para el crecimiento de esta bacteria en leche, ya que en ésta se estima que es de 0,99.

Por otro lado se ha visto que *E. coli* O157:H7 puede crecer en presencia de concentraciones de NaCl de 6,5 g/100 g en medio TSB, pero su crecimiento se inhibe cuando la concentración de NaCl en TSB es igual o superior a 8,5 g/100g (Farrokh et al., 2013; Glass et al., 1992).

## **Cuajada.**

La cuajada es el producto semisólido obtenido a partir de la leche coagulada por la acción del cuajo u otros coagulantes, sin la adición de fermentos lácticos. En este proceso no tiene lugar la separación del suero, por lo tanto contiene todos los componentes de la leche (Anónimo, 2007).

Los factores esenciales de composición y calidad de la cuajada establecidos en la legislación española son los siguientes:

- **Materia grasa.** El contenido mínimo de materia grasa de la cuajada será de 3,5 % sobre la parte láctea, salvo para las cuajadas semidesnatadas en las que el contenido mínimo será superior al 1 % y el máximo un 2 % y para las cuajadas desnatadas, en las que el máximo será 0,5 %.
- **Extracto seco magro lácteo mínimo.** Todas las cuajadas tendrán, en su parte láctea, un contenido mínimo de extracto seco magro del 11,5 % sobre el producto terminado.

La leche utilizada debe haber sido previamente pasteurizada o tratada en una instalación UHT. Se puede añadir también leche en polvo entera, semidesnatada o desnatada hasta alcanzar un extracto seco total mínimo del 15 %, y está permitida la adición de espesantes para conseguir la estructura deseada, pero sin sobrepasar los 7 g/kg de cuajada si se utiliza gelatina o las dosis permitidas de otros ingredientes. Se requiere refrigeración para su conservación.

## Yogurt.

La legislación española define el yogurt como el producto de la leche coagulada obtenido por fermentación láctica, mediante la acción de los microorganismos *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*, a partir de leche o de leche concentrada, desnatadas o no, o de nata, o de mezcla de dos o más de dichos productos, con o sin la adición de otros ingredientes lácteos, que previamente hayan sufrido un tratamiento térmico u otro tipo de tratamiento, equivalente, al menos, a la pasteurización (Anónimo, 2014).

Los factores esenciales de composición y calidad de los yogures establecidos en la legislación española son los siguientes:

- **pH.** Todos los yogures deberán tener un pH igual o inferior a 4,6.
- **Materia grasa láctea.** El contenido mínimo de materia grasa de los yogures, en su parte láctea, será de 2 % m/m, salvo para los yogures semidesnatados, en los que

---

será inferior a 2 y superior a 0,5 % m/m, y para los yogures desnatados, en los que será inferior a 0,5 % m/m.

- **Extracto seco magro lácteo.** Todos los yogures tendrán, en su parte láctea, un contenido mínimo de extracto seco magro de 8,5 % m/m.

Tanto los microorganismos presentes en la leche como las bacterias ácido lácticas utilizadas en la fabricación del yogurt pueden actuar de modo antagonista frente a las cepas de STEC, aunque poco se conoce sobre los mecanismos por los que se produce esta interacción (Dineen et al., 1998; Farrokh et al., 2013). Los mecanismos antimicrobianos específicos de las bacterias ácido lácticas que pueden inhibir cepas patógenas de *E. coli* incluyen la producción de ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, dióxido de carbono, diacetilo y bacteriocinas (De Vuyst & Vandamme, 1992; Farrokh et al., 2013).

Mediante el control de la temperatura, del pH y de la  $a_w$  podemos impedir el crecimiento de los microorganismos de forma segura, pero no siempre es posible su aplicación ya que modifican las propiedades de la leche y para la elaboración de determinados productos es necesario que ésta sea lo más natural posible, como es el caso de ciertas variedades de queso. Así mismo, los tratamientos empleados para controlar estos microorganismos pueden fallar en algún momento, por lo que un estudio de su comportamiento en distintos productos lácteos durante su vida útil puede servir para evaluar el riesgo de transmisión a los seres humanos a través de la alimentación.

En este capítulo se aborda el estudio de la modificación de algunos parámetros físicos y químicos sobre la supervivencia y crecimiento de cepas de tipos patógenos de *E. coli* y el comportamiento de las mismas durante la fabricación de productos derivados de leche de cabra (cuajada y yogurt).

## **MATERIAL Y MÉTODOS.**

### **1 - Microorganismos.**

Los experimentos descritos a continuación se realizaron con las cepas de *E. coli* aisladas de las muestras de leche de cabra de tanque como se describe en el Capítulo I.

### **2.- Comportamiento de cepas EPEC a baja temperatura y estudio de la temperatura mínima de crecimiento.**

Se sembraron en placas de SMAC (Oxoid) tres cepas EPEC (L6, L29a y L50). Todas las placas se incubaron a 37 °C durante 18 horas y posteriormente se transfirió una colonia aislada de cada cepa al correspondiente tubo con 10 ml de TSB (Oxoid). Se incubaron a 37 °C durante 6 horas. Se realizó un nuevo pase a TSB, inoculando 10 µl del cultivo anterior en 10 ml de caldo fresco. Se incubó durante 18 horas a 37 °C. Transcurrido el tiempo de incubación se realizaron diluciones decimales con el fin de obtener una concentración adecuada para realizar el inóculo de partida ( $\approx 10^2$  ufc/ml) en los tubos que se iban a incubar a distintas temperaturas. Para cada temperatura (6 °C, 8 °C, 10 °C y 15 °C) se inocularon 100 µl de la suspensión bacteriana de cada cepa en tubos que contenían 10 ml de TSB y en tubos que contenían 10 ml de leche estéril. Todos los inóculos se realizaron por triplicado, incluidos los controles, que eran los dos tipos de medio (leche y TSB) sin inóculo, y se incubaron a las distintas temperaturas durante 7 días.

Se realizó una siembra en placa de medio TSA (Oxoid) para comprobar la concentración del inóculo inicial en los tubos, incubándose a 37 °C durante 24 horas.

Transcurridos 7 días a las distintas temperaturas se realizó un análisis microbiológico de las muestras. Para ello se realizó una siembra de 100 µl en superficie de placas con SMAC (Oxoid) para observar el crecimiento de *E. coli*. Se incubaron a 37 °C durante 24 horas. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se calcularon los recuentos expresando los resultados en ufc/ml.

---

### 3 – Resistencia a la acidez.

Para comprobar la resistencia a la acidez que presentan las cepas de EPEC y STEC, se incorporaron a un medio base (TSB, Oxoid) dos tipos distintos de ácido, un ácido débil, como es el ácido láctico, y un ácido fuerte, como el ácido clorhídrico.

#### 3.1.- Elección de la concentración máxima de cada ácido a utilizar.

Se sembraron en placas de SMAC (Oxoid) tres cepas STEC (L10, L22 y L24a) y tres cepas EPEC (L6, L29a y L50) escogidas aleatoriamente entre todas las cepas aisladas procedentes de leche de tanque, pero en el caso de STEC se tuvo en cuenta que una de ellas fuera O157:H7 (L22). Todas las placas se incubaron a 37 °C durante 18 horas y posteriormente se transfirieron colonias aisladas a tubos de TSB (Oxoid) que se incubaron a 37 °C durante 24 horas. Transcurrido el tiempo de incubación se realizaron diluciones con el fin de obtener una concentración aproximada de  $10^3$  ufc/ml para realizar el inóculo ( $10^2$  ufc/ml) en los tubos que contenían distintas concentraciones de cada tipo de ácido. Las concentraciones utilizadas de ácido láctico (Panreac Química, Castellar del Vallès, Barcelona, España) y de ácido clorhídrico (Prolabo, VWR, Radnor, Pensilvania, EE.UU.) y el pH del medio obtenido en cada caso se muestran en las tablas IV.1 y IV.2.

Tabla IV.1. Condiciones finales de los medios preparados con diversas concentraciones de ácido láctico.

| Ácido láctico     |     |      |      |      |      |       |       |       |
|-------------------|-----|------|------|------|------|-------|-------|-------|
| Concentración (%) | 0   | 0,1  | 0,3  | 0,5  | 0,8  | 1     | 1,3   | 1,5   |
| Molaridad (M)     | 0   | 1,14 | 3,43 | 5,71 | 9,14 | 11,42 | 14,85 | 17,13 |
| pH                | 7,6 | 7    | 5,5  | 4,6  | 4,3  | 4     | 3,6   | 3,5   |

Tabla IV.2. Condiciones finales de los medios preparados con diversas concentraciones de ácido clorhídrico.

| Ácido clorhídrico |      |      |      |      |      |      |      |       |
|-------------------|------|------|------|------|------|------|------|-------|
| Concentración (%) | 0    | 0,05 | 0,08 | 0,1  | 0,3  | 0,5  | 0,8  | 1     |
| Molaridad (M)     | 0    | 0,56 | 0,9  | 1,12 | 3,37 | 5,62 | 9,75 | 11,23 |
| pH                | 7,42 | 6,41 | 5,32 | 4,81 | 2,37 | 1,34 | 0,95 | 0,80  |

Como control de crecimiento se utilizó medio TSB sin ácido en el que se inoculó la bacteria del mismo modo que en los otros tubos, utilizando como blanco tubos de medio sin inocular. Tanto los controles como las distintas concentraciones de ácido se realizaron por triplicado y se incubaron a 37 °C. Se midió la absorbancia a 450 nm empleando el espectrofotómetro de microplacas Thermo Scientific Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.), transcurridas 3, 6 y 24 horas tras la inoculación.

### 3.2.- Tolerancia de las cepas *E. coli* EPEC a una concentración de ácido láctico 3,43 M o de ácido clorhídrico 3,37 M.

Se recuperaron 9 cepas de *E. coli* EPEC aisladas de leche (L6, L29a, L29b, L36, L37a, L37b, L42b, L50 y L53) mediante siembra en superficie sobre el medio sólido SMAC (Oxoid) incubándolas a 37 °C. Tras 24 horas de incubación se transfirió una colonia aislada a un tubo estéril que contiene 10 ml de TSB (Oxoid) para incubarlo nuevamente a 37 °C durante 6 horas. Posteriormente se hizo una dilución 1:10 y se incubó a 37 °C durante 18 horas. Posteriormente, se hizo una nueva dilución 1:10 y seguidamente se hizo una siembra en superficie de 100 µl de dicha dilución en placas de SMAC (Oxoid), y se inoculó 1 ml de la misma dilución ( $\approx 10^3$  ufc/ml) en un tubo estéril que contenía 9 ml de TSB (Oxoid) con ácido láctico 3,43 M (Panreac Química), y 1 ml en un tubo estéril que contenía 9 ml de TSB (Oxoid) con 3,37 M de ácido clorhídrico (Prolabo).

---

La siembra en placa se hizo por duplicado y la inoculación en tubo se hizo por triplicado. Ambas se incubaron a 37 °C durante 24 horas. En el caso de los tubos se midió la absorbancia a 450 nm sobre una alícuota de 200 µl empleando el espectrofotómetro de microplacas Thermo Scientific Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific), transcurridas 3, 6 y 24 horas desde la inoculación, con el fin de observar la evolución del crecimiento bacteriano en condiciones de acidez. Asimismo, una vez finalizado el período de incubación, se realizó una siembra en placas de medio TSA, (Oxoid) para establecer el recuento de bacterias. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 horas.

### **3.3.- Tolerancia de las cepas *E. coli* STEC a una concentración de ácido láctico 3,43 M o de ácido clorhídrico 3,37 M.**

Se recuperaron 9 cepas de *E. coli* STEC aisladas de leche, de las cuales una corresponde al serogrupo O157 (L22) y las ocho restantes son no-O157 (L10, L24a, L24b, L26, L27a, L27b, L31 y L42). Se sembraron en placas de medio SMAC (Oxoid) incubándolas a 37 °C durante 24 horas, y se llevó a cabo el experimento del mismo modo descrito en el apartado anterior para las cepas *E. coli* EPEC.

## **4.- Influencia de la actividad de agua, y del soluto empleado para modificarla, en el crecimiento de cepas EPEC.**

En este experimento se emplearon 3 cepas de EPEC: L6, L29a y L50.

Como caldo base se utilizó TSB (Oxoid), y se modificó la  $a_w$  empleando distintas concentraciones de los solutos: NaCl (Prolabo), glicerol (Acofarma, Barcelona, España) y sacarosa (Panreac Química) (Chen, 1989). Se ajustó el medio a pH 7,3 y se repartió cada concentración en 4 tubos de ensayo (9 ml por tubo), uno para utilizarlo como control sin inocular, y los otros 3 para inocularlos con las distintas cepas. Los tubos se esterilizaron a 120 °C/15 minutos.

La  $a_w$  de cada caldo utilizado, una vez esterilizado, se midió utilizando el equipo Aqualab CX2 (Decagon Devices, Pullman, WA, EE.UU.). Se colocaron las muestras en los recipientes facilitados por el fabricante cubriendo completamente el fondo y no sobrepasando la mitad de su capacidad. Se introdujeron estas muestras en el aparato a temperatura ambiente y se procedió a su lectura.

La  $a_w$  correspondiente a cada concentración de soluto se muestra en la tabla IV.3.

Tabla IV.3. Actividad de agua del medio líquido en función de la concentración de cada soluto añadido.

|                     |            |             |             |             |             |             |             |             |
|---------------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| <b>[NaCl] %</b>     | <b>0</b>   | <b>0,9</b>  | <b>1,8</b>  | <b>3,4</b>  | <b>6,5</b>  | <b>9,3</b>  | <b>11,9</b> | <b>14,2</b> |
| $a_w$               | 1,00       | 1,00        | 0,99        | 0,98        | 0,97        | 0,94        | 0,94        | 0,92        |
| <b>[Glicerol] %</b> | <b>2,6</b> | <b>4,9</b>  | <b>9,4</b>  | <b>16,1</b> | <b>23,1</b> | <b>28,6</b> | <b>33,5</b> |             |
| $a_w$               | 1,00       | 0,99        | 0,98        | 0,96        | 0,95        | 0,93        | 0,91        |             |
| <b>[Sacarosa] %</b> | <b>9,2</b> | <b>15,9</b> | <b>26,2</b> | <b>39,7</b> | <b>48,4</b> | <b>54,6</b> | <b>59,2</b> |             |
| $a_w$               | 1,00       | 0,99        | 0,98        | 0,97        | 0,96        | 0,94        | 0,93        |             |

Los tubos se inocularon con 1 ml de una suspensión que contenía  $10^2$  ufc/ml de las cepas y se incubaron durante 48 horas, tomando muestras a las 6, 18, 24 y 48 horas para medir la absorbancia a 450 y 620 nm empleando el equipo Thermo Scientific Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific), comprobando así la evolución del crecimiento.

En los tubos, que tras el periodo de incubación no mostraron turbidez, se comprobó la ausencia de crecimiento mediante siembra en placas de TSA (Oxoid), incubando a 37 °C/18h.

## 5.- Evaluación del comportamiento de cepas STEC y EPEC en la cuajada.

Para la elaboración de la cuajada se adquirió leche de cabra en una explotación dedicada al abastecimiento de industrias lácteas y se pasteurizó, aplicando una

---

temperatura de 63 °C durante 30 minutos. Mientras se enfriaba la leche hasta los 36 °C, se repartió en los volúmenes correspondientes para la fabricación de los 5 tipos de cuajada que se iban a elaborar.

1. Cuajada control (sin inocular con bacterias)
2. Cuajada STEC 1-10 ufc/ml (inoculada con la cepa L22)
3. Cuajada EPEC 1-10 ufc/ml (inoculada con la cepa L6)
4. Cuajada STEC 100-1000 ufc/ml (inoculada con la cepa L22)
5. Cuajada EPEC 100-1000 ufc/ml (inoculada con la cepa L6)

En cada recipiente se añadió el inóculo bacteriano correspondiente a cada tipo de cuajada preparado mediante diluciones, como se ha descrito en los experimentos anteriores, hasta obtener las concentraciones adecuadas. Se añadió el cuajo líquido de origen animal (fuerza 1:10000 y una concentración de quimosina superior al 75 %) (Laboratorios Arroyo, Santander, Cantabria, España) en una proporción de 40 ml de cuajo/100 l de leche. Se homogeneizaron bien las mezclas y cada tipo de cuajada se repartió en 10 envases individuales que contenían 100 ml de producto cada uno. Se incubó a 37 °C durante 2 horas y 30 minutos para que se formara bien la cuajada y los envases se mantuvieron a 4 °C durante 15 días (Madrid, 1996).

Se tomaron dos muestras de cada tipo de cuajada tras la fabricación ( $t_0$ ), a las 24 horas ( $t_1$ ), a los tres días ( $t_3$ ), a los siete días ( $t_7$ ) y a los 15 días ( $t_{15}$ ). Para cada muestra se midió el pH y se realizó un análisis microbiológico para determinar la concentración de *E. coli*.

La medición de pH se realizó con un pH-metro Crison, micro pH 2001 (Crison Instruments, Alella, Barcelona, España) introduciendo la sonda en la muestra de la que se quería conocer el pH.

El análisis microbiológico se realizó homogeneizando 10 g de producto con 40 ml de BPW (Oxoid) y se sembraron en superficie de placas SMAC (Oxoid) 100  $\mu$ l de ese homogeneizado. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 horas, y posteriormente se realizó el recuento.

## 6.- Evaluación del comportamiento de cepas STEC y EPEC en yogurt.

Para la elaboración del yogurt se compraron yogures naturales en un establecimiento comercial y leche de cabra en una explotación cuya producción se suministraba a una industria láctea. Tras realizar la pasteurización de la leche a 63 °C durante 30 minutos, se procedió a la elaboración del yogurt siguiendo las pautas de elaboración tradicional. Así:

Se atemperó la leche a 30 °C y se repartió en los volúmenes adecuados para la fabricación de 5 tipos de yogurt:

1. Yogurt control (sin inocular con bacterias)
2. Yogurt STEC 1-10 ufc/ml (inoculada con la cepa L22)
3. Yogurt EPEC 1-10 ufc/ml (inoculada con la cepa L6)
4. Yogurt STEC 100-1000 ufc/ml (inoculada con la cepa L22)
5. Yogurt EPEC 100-1000 ufc/ml (inoculada con la cepa L6)

Para la elaboración de cada tipo de yogurt se mezclaron 1200 ml de leche de cabra con 150 g de yogurt natural comercial (125 g por cada litro de leche) y el inóculo de cepas de *E. coli* preparado mediante diluciones, como se ha descrito en los experimentos anteriores, hasta obtener las concentraciones señaladas anteriormente. Se homogeneizaron bien las mezclas y cada tipo de yogurt se repartió en 12 envases individuales que contenían 100 ml de producto cada uno. Se incubó a 42 °C durante 8 horas para permitir la formación del yogurt y posteriormente se conservó a 4 °C durante 30 días.



Figura IV.1. Elaboración del yogurt.

Se tomaron dos muestras de cada tipo de yogurt tras la fabricación ( $t_0$ ), a las 24 horas ( $t_1$ ), a los tres días ( $t_3$ ), a los siete días ( $t_7$ ), a los 15 días ( $t_{15}$ ) y a los 30 días ( $t_{30}$ ). Para cada muestra se midió el pH, se valoró el contenido en ácido láctico (acidez titulable) y se realizó un análisis microbiológico para determinar los niveles de *E. coli* en las muestras.

La medición de pH se realizó con un pH-metro Crison, micro pH 2001 (Crison Instruments) introduciendo la sonda en la muestra.

La acidez se midió por titulación y corresponde a la cantidad de hidróxido de sodio (NaOH) utilizado para neutralizar los grupos ácidos. Este método consiste en pesar en un matraz 10 g de producto, añadir 4 gotas de fenolftaleína al 1 % en etanol (Panreac Química), mezclar bien y valorar el contenido de ácido láctico mediante la adición de NaOH (Prolabo) N/9 hasta que aparezca una coloración rosácea persistente durante al menos 30 segundos (Alais, 1985).

El recuento de *E. coli* se realizó homogeneizando 10 g de la muestra con 40 ml de BPW (Oxoid), sembrando, en superficie de placas SMAC (Oxoid), 100  $\mu$ l del homogeneizado. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 horas, y posteriormente se realizó el recuento de colonias de *E. coli*.

## RESULTADOS.

### 1.- Comportamiento de cepas EPEC a baja temperatura y estudio de la temperatura mínima de crecimiento.

En la figura IV.2. se muestra el comportamiento de tres cepas EPEC (L6, L29a y L50) incubadas en dos medios distintos, leche de cabra UHT y caldo TSB, durante siete días a distintas temperaturas.

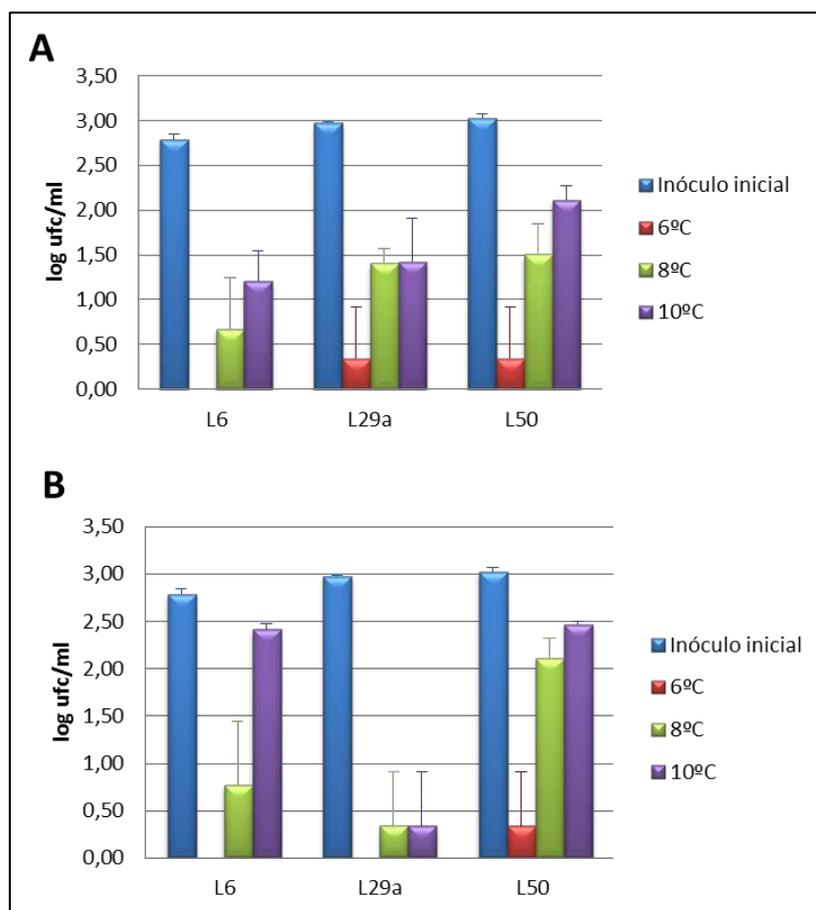


Figura IV.2. Comportamiento de tres cepas EPEC (L6, L29a y L50) incubadas en dos medios distintos, leche de cabra UHT (A) y TSB (B).

En leche de cabra las tres cepas de EPEC tuvieron un comportamiento similar, observándose mayor inactivación a las temperaturas más bajas, pero aumentando la supervivencia a medida que aumentaba la temperatura hasta observar crecimiento a 15 °C (datos no mostrados en la gráfica por tratarse de un césped de células).

Una tendencia similar se apreció en las mismas cepas cuando crecen en caldo TSB. La tolerancia a bajas temperaturas parece un poco mayor en el caso de la cepa

---

L50 tanto en leche como en caldo, siendo superior en este último, pero hasta que no se alcanza la temperatura de 15 °C no se aprecia crecimiento (dato no mostrado por la razón antes indicada).

Estudiando el comportamiento general tanto en leche como en caldo TSB de las distintas cepas, comprobamos que la cepa L50 tolera mejor las temperaturas bajas que las otras dos (L6 y L29a).

## **2.- Resistencia a la acidez.**

### **2.1.- Tolerancia de cepas de *E. coli* EPEC y STEC a distintas concentraciones de ácido láctico y ácido clorhídrico.**

En las tablas IV.4, IV.5 y IV.6 se muestran los valores medios de absorbancia medidos a 450 nm, y la desviación estándar, correspondiente a un cultivo de 24 horas de las tres cepas estudiadas de cada tipo de *E. coli* (EPEC L6, L29a y L50, y STEC L10, L22 y L24a) en función de la concentración molar de ácido láctico presente en el caldo TSB, y los mismos parámetros para la cepa EPEC (L6) con la que se comprobó la concentración máxima de ácido clorhídrico que toleran las cepas de *E. coli*. La tolerancia al ácido clorhídrico se realizó únicamente con una cepa EPEC en base a los resultados obtenidos en el análisis de la tolerancia a ácido láctico, tras comprobar que los dos patotipos se comportaban de modo similar.

Tabla IV.4. Valores medios de absorbancia a 450 nm que presentaban tres cultivos de cepas EPEC (L6, L29a y L50) tras 24 horas de incubación en caldo TSB con distintas concentraciones de ácido láctico.

|                     |                | L6          |            | L29a      |          | L50       |          |
|---------------------|----------------|-------------|------------|-----------|----------|-----------|----------|
|                     |                | $\bar{X}^a$ | $\sigma^b$ | $\bar{X}$ | $\sigma$ | $\bar{X}$ | $\sigma$ |
| [ M ] ácido láctico | 0              | 0,749       | 0,009      | 0,718     | 0,004    | 0,803     | 0,030    |
|                     | 1,14           | 0,393       | 0,150      | 0,619     | 0,017    | 0,615     | 0,066    |
|                     | 3,43           | 0,264       | 0,045      | 0,398     | 0,083    | 0,355     | 0,032    |
|                     | 5,71           | 0,124       | 0,005      | 0,115     | 0,004    | 0,137     | 0,005    |
|                     | 9,14           | 0,121       | 0,001      | 0,123     | 0,004    | 0,128     | 0,006    |
|                     | Control (9,14) | 0,133       | 0,004      | 0,102     | 0,042    | 0,132     | 0,005    |

$\bar{X}^a$  media aritmética.  
 $\sigma^b$  desviación estándar.

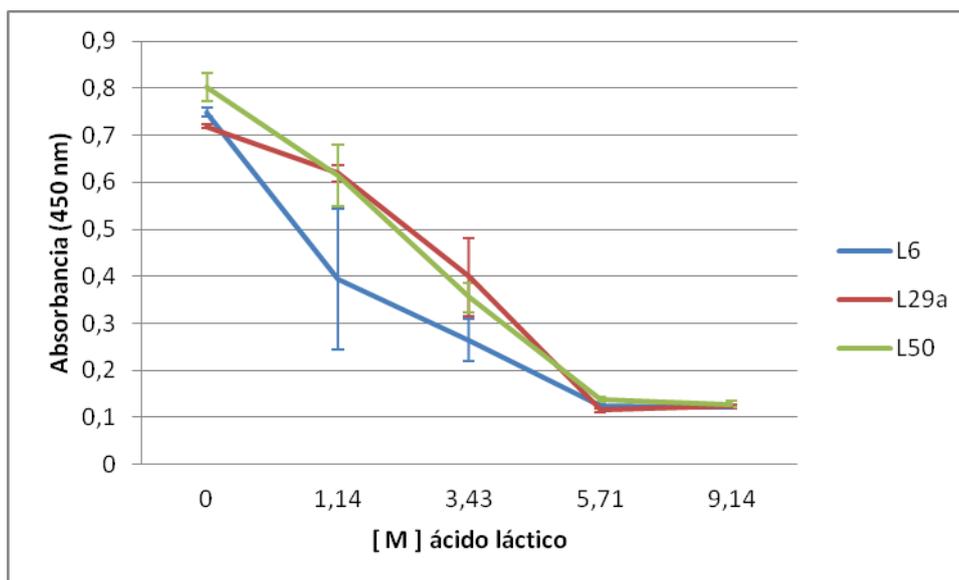


Figura IV.3. Representación gráfica de la tolerancia de tres cepas EPEC (L6, L29a y L50) a distintas concentraciones de ácido láctico.

Tabla IV.5. Valores medios de absorbancia a 450 nm que presentabann tres cultivos de cepas STEC (L10, L22 y L24) tras 24 horas de incubación en un medio de cultivo con distintas concentraciones de ácido láctico.

|                     |                    | L10         |            | L22       |          | L24       |          |
|---------------------|--------------------|-------------|------------|-----------|----------|-----------|----------|
|                     |                    | $\bar{X}^a$ | $\sigma^b$ | $\bar{X}$ | $\sigma$ | $\bar{X}$ | $\sigma$ |
| [ M ] ácido láctico | 0                  | 0,574       | 0,018      | 0,707     | 0,037    | 0,693     | 0,026    |
|                     | 1,14               | 0,465       | 0,025      | 0,511     | 0,008    | 0,537     | 0,026    |
|                     | 3,43               | 0,155       | 0,035      | 0,187     | 0,008    | 0,199     | 0,014    |
|                     | 5,71               | 0,106       | 0,012      | 0,087     | 0,003    | 0,088     | 0,002    |
|                     | 9,14               | 0,107       | 0,013      | 0,087     | 0,002    | 0,087     | 0,001    |
|                     | 11,42              | 0,087       | 0,001      | 0,088     | 0,001    | 0,089     | 0,002    |
|                     | 14,85              | 0,088       | 0,003      | 0,089     | 0,002    | 0,089     | 0,002    |
|                     | 17,13              | 0,087       | 0,003      | 0,088     | 0,002    | 0,088     | 0,001    |
|                     | Control<br>(17,13) | 0,083       | 0,002      | 0,088     | 0,001    | 0,088     | 0,002    |

$\bar{X}^a$  media aritmética.  
 $\sigma^b$  desviación estándar.

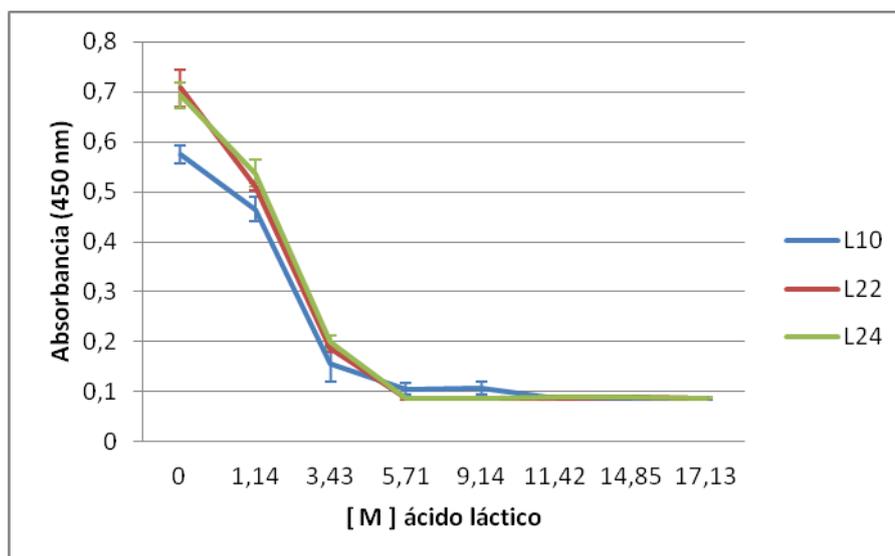


Figura IV.4. Representación gráfica de la tolerancia de tres cepas STEC (L10, L22 y L24) a distintas concentraciones de ácido láctico.

Tabla IV.6. Valores medios de absorbancia a 450 nm que presentaba la cepa EPEC L6 tras 24 horas de crecimiento en presencia de distintas concentraciones ácido clorhídrico.

|                         |               | L6            |            |                      |               |
|-------------------------|---------------|---------------|------------|----------------------|---------------|
|                         |               | $\bar{X}^a$   | $\sigma^b$ | Crecimiento en placa |               |
| [ M ] Ácido clorhídrico | 0             | 0 %           | 0,694      | 0,018                | césped        |
|                         | 0,56          | 0,05 %        | 0,444      | 0,005                | césped        |
|                         | 0,9           | 0,08 %        | 0,305      | 0,013                | césped        |
|                         | 1,12          | 0,10 %        | 0,225      | 0,003                | césped        |
|                         | 3,37          | 0,30 %        | 0,194      | 0,013                | 12.000 ufc/ml |
|                         | 5,62          | 0,50 %        | 0,270      | 0,001                | No crece      |
|                         | 9,75          | 0,80 %        | 0,357      | 0,001                | No crece      |
|                         | 11,23         | 1 %           | 0,423      | 0,003                | No crece      |
|                         | Control 11,23 | Control (1 %) | 0,421      | 0,027                | No crece      |

$\bar{X}^a$  media aritmética.

$\sigma^b$  desviación estándar.

Se observó que las cepas analizadas, tanto las tres cepas STEC (L10, L22 y L24a), como las tres cepas de EPEC (L6, L29a y L50) solamente sobrevivían a concentraciones inferiores a 3,43 M (pH 5,5) en el caso del ácido láctico, y 3,37 M (pH 2,37) en el caso del ácido clorhídrico.

## 2.2.- Tolerancia de las cepas de *E. coli* EPEC a una concentración de ácido láctico 3,43 M y de ácido clorhídrico 3,37 M.

Las nueve cepas de *E. coli* EPEC aisladas de leche de cabra (L6, L29a, L29b, L36, L37a, L37b, L42b, L50 y L53) analizadas en este estudio fueron capaces de sobrevivir en las dos concentraciones de ácido seleccionadas (3,43 M de ácido láctico y 3,37 M de ácido clorhídrico), apreciándose valores de absorbancia que varían entre 0,138 y 0,323 en el caso del crecimiento en ácido láctico y entre 0,171 y 0,204 en el caso del ácido clorhídrico. En general se observa un mayor crecimiento en el medio que contiene ácido láctico, aunque la cepa L6 presenta un comportamiento opuesto a la mayoría,

sobrevive mejor en presencia de ácido clorhídrico que en ácido láctico (tablas IV.7 y IV.8).

Tabla IV.7. Valores de absorbancia referentes a cepas EPEC incubadas en presencia de ácido láctico.

| Ácido láctico 3,43 M |             |            |
|----------------------|-------------|------------|
| Cepa                 | Abs. 450 nm |            |
|                      | $\bar{X}^a$ | $\sigma^b$ |
| L6                   | 0,138       | 0,004      |
| L29a                 | 0,280       | 0,013      |
| L29b                 | 0,287       | 0,014      |
| L36                  | 0,280       | 0,009      |
| L37a                 | 0,281       | 0,010      |
| L37b                 | 0,282       | 0,004      |
| L42b                 | 0,300       | 0,006      |
| L50                  | 0,294       | 0,004      |
| L53                  | 0,323       | 0,018      |
| Control              | 0,116       | 0,023      |

$\bar{X}^a$  media aritmética.

$\sigma^b$  desviación estándar.

Tabla IV.8. Valores de absorbancia referentes a cepas EPEC incubadas en presencia de ácido clorhídrico.

| Ácido clorhídrico 3,37 M |             |            |
|--------------------------|-------------|------------|
| Cepa                     | Abs. 450 nm |            |
|                          | $\bar{X}^a$ | $\sigma^b$ |
| L6                       | 0,204       | 0,013      |
| L29a                     | 0,173       | 0,015      |
| L29b                     | 0,171       | 0,006      |
| L36                      | 0,173       | 0,012      |
| L37a                     | 0,187       | 0,002      |
| L37b                     | 0,176       | 0,002      |
| L42b                     | 0,189       | 0,004      |
| L50                      | 0,172       | 0,011      |
| L53                      | 0,179       | 0,017      |
| Control                  | 0,078       | 0,001      |

$\bar{X}^a$  media aritmética.

$\sigma^b$  desviación estándar.

### 2.3.- Tolerancia de las cepas *E.coli* STEC a una concentración de ácido láctico 3,43 M y de ácido clorhídrico 3,37 M.

Las nueve cepas de *E. coli* STEC analizadas, de las cuales una corresponde al serogrupo O157 (L22) y las ocho restantes no-O157 (L10, L24a, L24b, L26, L27a, L27b, L31 y L42), eran capaces de sobrevivir en las dos concentraciones de ácido seleccionadas. Se observa una mayor supervivencia en el medio de cultivo que contiene ácido láctico, obteniéndose unos valores de absorbancia que varían entre 0,200 y 0,249 en el caso del ácido láctico y entre 0,186 y 0,241 en el caso del ácido clorhídrico (tablas IV.9 y IV.10).

Tabla IV.9. Valores de absorbancia referentes a cepas STEC incubadas en presencia de ácido láctico.

| Ácido láctico 3,43 M |             |            |
|----------------------|-------------|------------|
| Cepa                 | Abs. 450 nm |            |
|                      | $\bar{X}^a$ | $\sigma^b$ |
| L10                  | 0,200       | 0,001      |
| L22                  | 0,249       | 0,001      |
| L24a                 | 0,225       | 0,001      |
| L24b                 | 0,233       | 0,002      |
| L26                  | 0,239       | 0,000      |
| L27a                 | 0,246       | 0,000      |
| L27b                 | 0,247       | 0,001      |
| L31                  | 0,238       | 0,001      |
| L42                  | 0,235       | 0,002      |
| Control              | 0,122       | 0,003      |

$\bar{X}^a$  media aritmética.  
 $\sigma^b$  desviación estándar.

Tabla IV.10. Valores de absorbancia referentes a cepas STEC incubadas en presencia de ácido clorhídrico.

| Ácido clorhídrico 3,37 M |             |            |
|--------------------------|-------------|------------|
| Cepa                     | Abs. 450 nm |            |
|                          | $\bar{X}^a$ | $\sigma^b$ |
| L10                      | 0,213       | 0,012      |
| L22                      | 0,241       | 0,013      |
| L24a                     | 0,198       | 0,001      |
| L24b                     | 0,186       | 0,011      |
| L26                      | 0,2         | 0,003      |
| L27a                     | 0,206       | 0,002      |
| L27b                     | 0,192       | 0,002      |
| L31                      | 0,199       | 0,002      |
| L42                      | 0,194       | 0,009      |
| Control                  | 0,087       | 0,001      |

$\bar{X}^a$  media aritmética.  
 $\sigma^b$  desviación estándar.

### 3 - Influencia de la actividad de agua, y del soluto empleado para modificarla, en el crecimiento de cepas EPEC.

El empleo de NaCl para disminuir la actividad de agua del medio no permitió observar un crecimiento de bacterias por debajo de 0,94  $a_w$  como se puede observar en la figura IV.5. En cambio, si se emplea glicerol, la  $a_w$  mínima que permite el crecimiento de nuestras cepas disminuyó hasta 0,93, e incluso 0,91 en el caso de la cepa L50. Cuando empleamos sacarosa para modificar la  $a_w$  no se observa una tendencia clara, la cepa L6 es capaz de sobrevivir bastante bien a de 0,93  $a_w$ , pero con las otras dos cepas, L29a y L50 se observa lo contrario, incluso a una  $a_w$  relativamente alta, 0,96, prácticamente no sobreviven (figura IV.5).

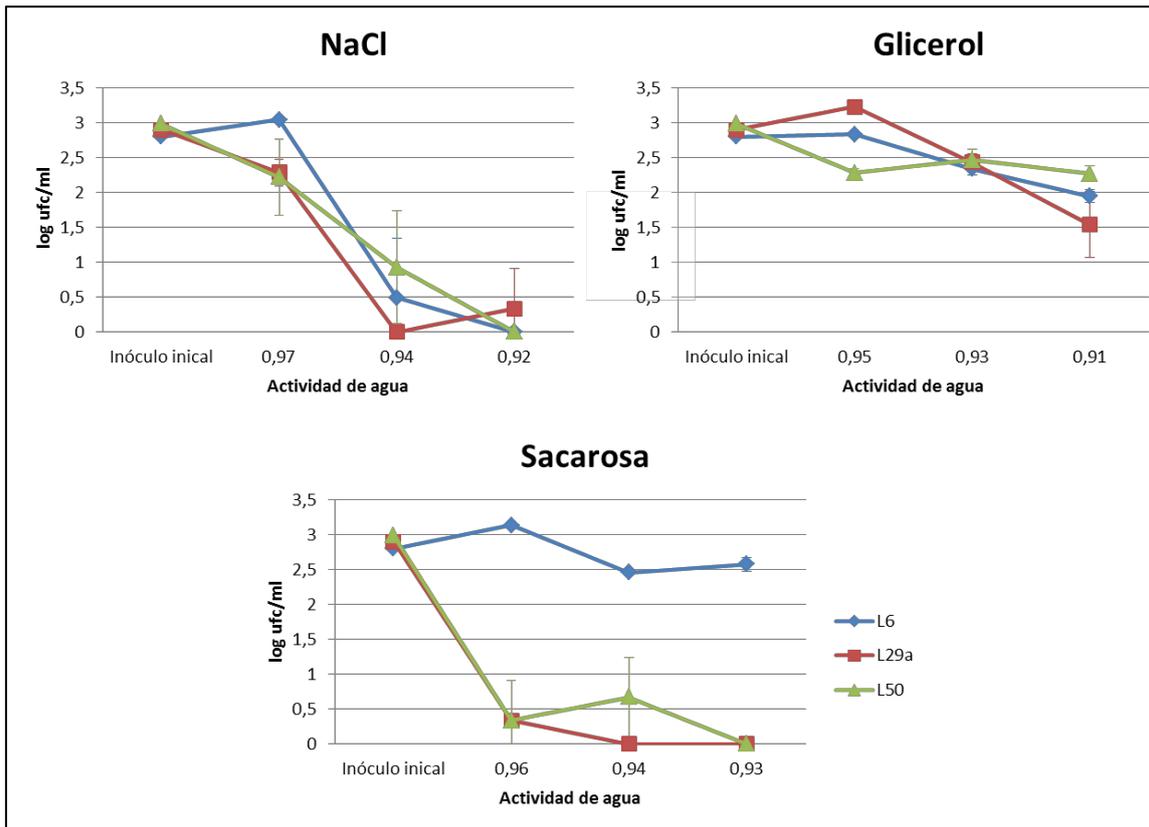


Figura IV.5. Comportamiento de cepas EPEC en un medio con distintos valores de  $a_w$  obtenidos mediante adición de diferentes concentraciones de NaCl, glicerol y sacarosa.

#### 4 - Evaluación del comportamiento de cepas STEC y EPEC en la cuajada.

Analizando la evolución de las dos cepas de *E. coli* (una EPEC y otra STEC), con las que se inculó la leche, durante el proceso de elaboración de la cuajada y hasta el fin de su vida útil, observamos que los recuentos de *E. coli* aumentan durante el proceso de coagulación y que durante el almacenamiento se produce un descenso brusco entre el segundo y el tercer día tras el fin de la elaboración.

En el proceso de coagulación los recuentos de los inóculos más bajos (1-10 ufc/ml) aumentan hasta  $3,41 \pm 0,08$  log ufc/ml en el caso de EPEC y  $3,68 \pm 0,16$  log ufc/ml en el caso de STEC. Para los inóculos con mayor concentración de *E. coli* (100 - 1000 ufc/ml), se obtuvieron recuentos, al final del proceso de fabricación, de  $4,45 \pm 0,01$  log ufc/ml para EPEC y  $4,39 \pm 0,01$  log ufc/ml para STEC.

Durante el periodo de almacenamiento a 4 °C se observa un descenso en el número de células de *E. coli*, tanto de EPEC como de STEC, disminuyendo los recuentos en el caso de los inóculos de mayor concentración hasta  $1,77 \pm 0,15$  log ufc/ml para EPEC y  $2,41 \pm 0,42$  log ufc/ml para STEC tras siete días de almacenamiento, no detectándose a los 15 días. No ocurre lo mismo con los inóculos con menor concentración de *E. coli*, cuyo recuento disminuye ligeramente, menos de una unidad logarítmica, incluso tras 15 días de almacenamiento a 4 °C. Figura IV.6.

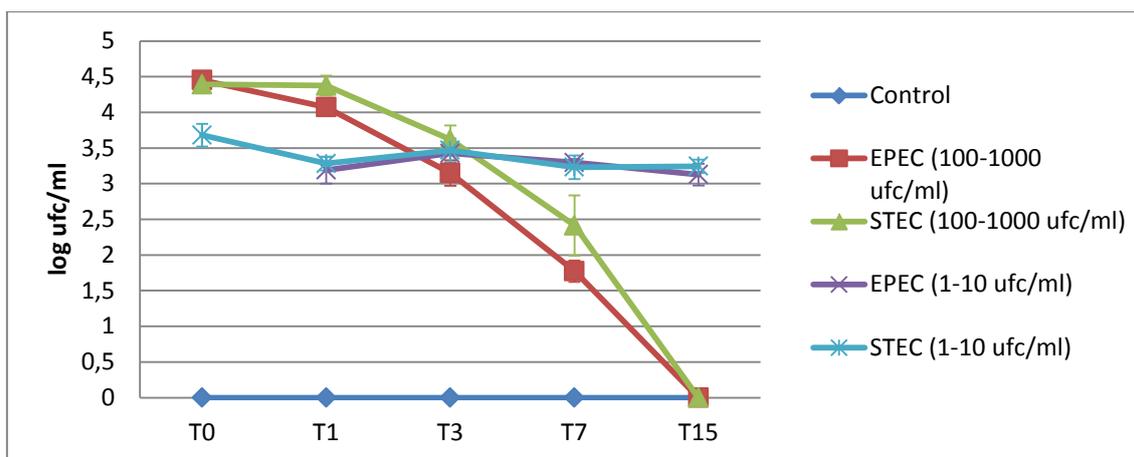


Figura IV.6. Evolución del desarrollo de cepas de *E. coli* EPEC y STEC en cuajada durante el periodo de almacenamiento en condiciones de refrigeración.

Analizando cómo afecta el pH de la cuajada al comportamiento de las cepas inoculadas, comprobamos que apenas influye, ya que éste se mantiene bastante estable, entre 6,6 y 6,8 a lo largo de todo el periodo objeto de estudio.

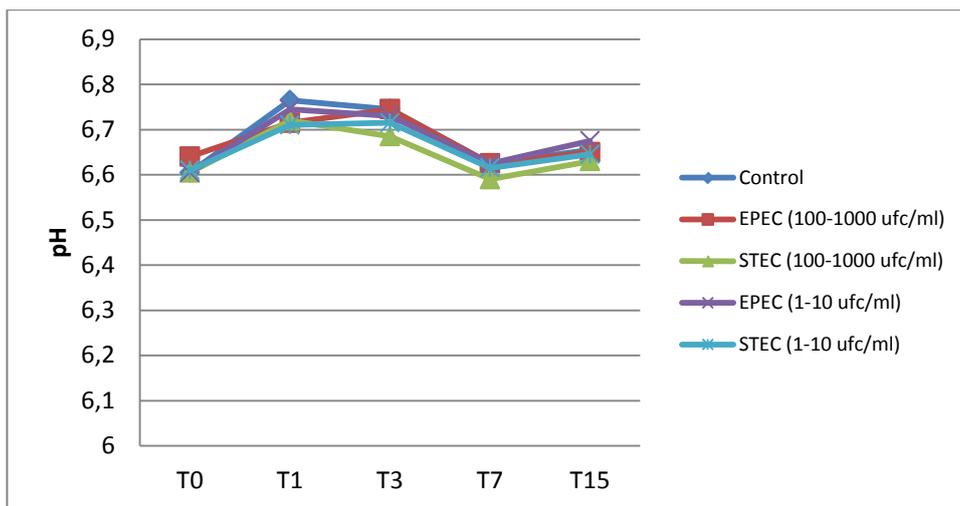


Figura IV.7. Evolución del pH de la cuajada durante el periodo de almacenamiento en condiciones de refrigeración.

## 5 - Evaluación del comportamiento de cepas STEC y EPEC en yogurt.

Los recuentos de las dos cepas de *E. coli* (una EPEC y otra STEC) inoculados en la leche destinada a la elaboración del yogurt demuestran que, para los inóculos más bajos (1-100 ufc/ml), apenas aumenta la concentración de *E. coli* durante la fermentación, mientras que para los de mayor concentración (100 - 1000 ufc/ml), éstos aumentan hasta alcanzar niveles, al final del proceso, de  $4,6 \pm 0,1$  log ufc/ml en el caso de EPEC y  $4,5 \pm 0,2$  log ufc/ml en el caso de STEC.

Durante el periodo de almacenamiento a 4 °C se produce un descenso en el número de células de *E. coli*, tanto de EPEC como de STEC, más acusado en los yogures con inóculos de mayor concentración. En este caso, los recuentos disminuyen hasta hallar en el séptimo día tras la elaboración  $3,1 \pm 0,2$  log ufc/ml para EPEC y a los 15 días  $1,7 \pm 0,0$  log ufc/ml para STEC, no detectándose ninguna de las dos cepas a los 28 días de almacenamiento a 4 °C. Figura IV.8.

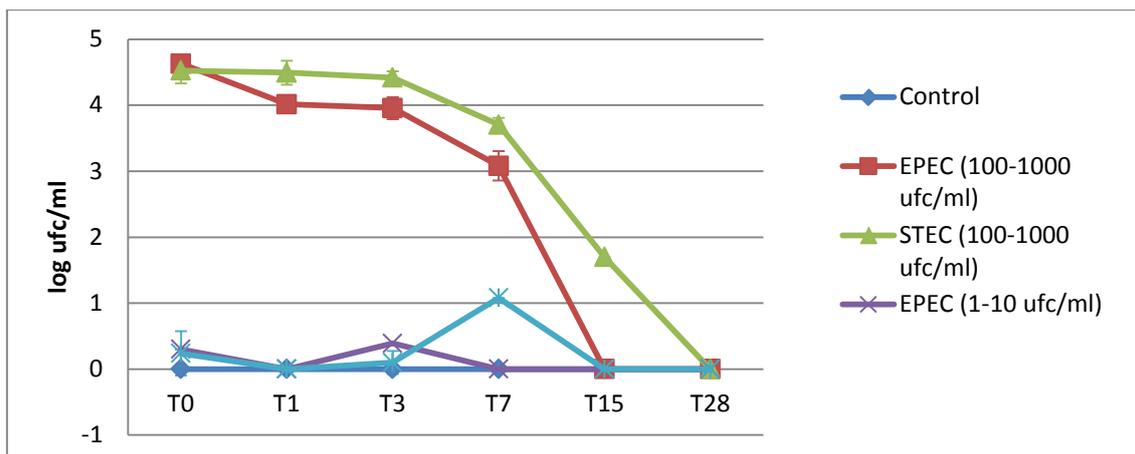


Figura IV.8. Evolución del desarrollo de *E. coli* en yogurt durante el periodo de almacenamiento en condiciones de refrigeración.

Si observamos cómo afecta el pH durante el almacenamiento del yogurt (figura IV.9), comprobamos que se produce un descenso acusado de éste durante el primer día de almacenamiento a 4 °C que podría contribuir al descenso en el número de células de *E. coli*. Posteriormente los valores de pH se mantienen estables, entre 4,1 y 4,3, a lo largo de todo el periodo de tiempo estudiado, no influyendo en la evolución de los distintos tipos de inóculo. por lo que no influye en la evolución de los distintos tipos de inóculo.

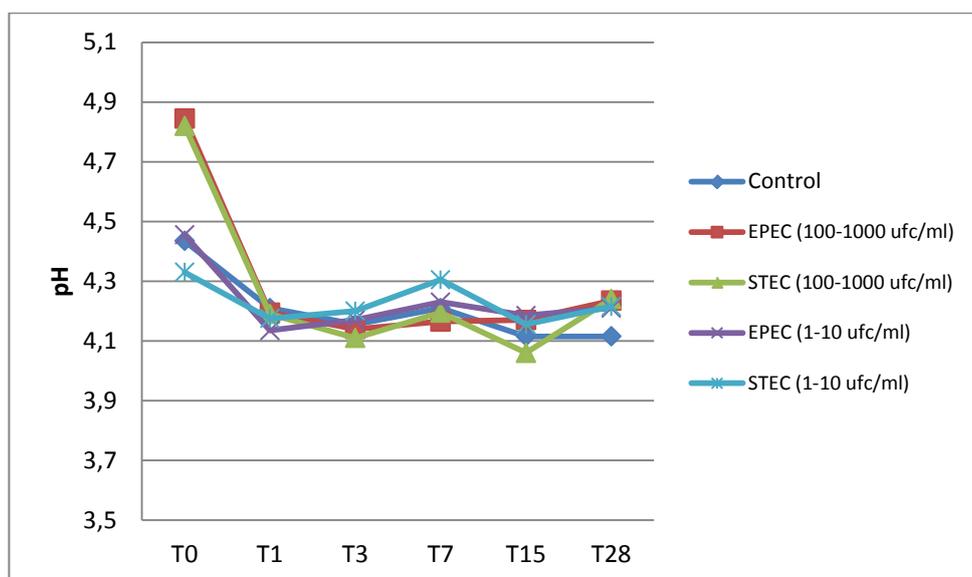


Figura IV.9. Evolución del pH del yogurt durante el periodo de almacenamiento en condiciones de refrigeración.

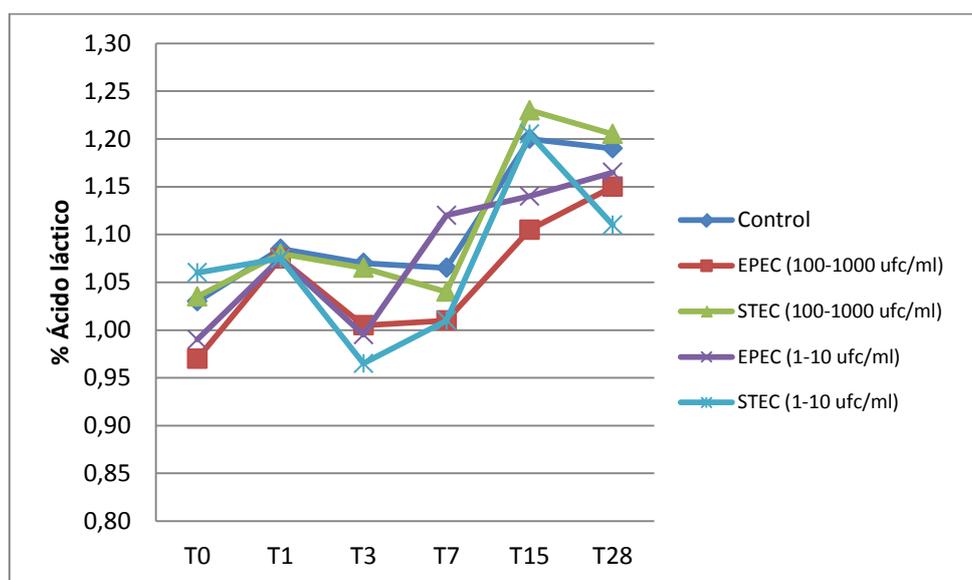


Figura IV.10. Evolución de la acidez titulable del yogurt durante el periodo de almacenamiento en condiciones de refrigeración.

## DISCUSIÓN.

La supervivencia y el crecimiento de los patotipos de *E. coli* estudiados depende, como para muchas otras bacterias, de diversos factores intrínsecos y extrínsecos como son temperatura, pH,  $a_w$  y también la composición del medio donde se encuentran. En cuanto a la temperatura, para estas bacterias, se ha descrito que el óptimo se encuentra entre 35-40 °C y no se consideran psicrotrofas, no obstante se ha visto que pueden crecer y sobrevivir en un rango que va desde los 7-8 °C hasta 46 °C (Yates, 2011). En nuestro estudio hemos observado que las cepas EPEC prácticamente no sobreviven por debajo de 10 °C, pero a 15 °C, no solo sobreviven sino que además son capaces de multiplicarse. Resultados similares se obtuvieron tanto para los cultivos en leche, donde la supervivencia de las células ha sido ligeramente superior, como para los cultivos en caldo TSB. Este resultado es interesante desde el punto de vista de la proliferación de estas cepas en alimentos que pudieran haberse visto expuestos a una ruptura de la cadena de frío, ya que hemos comprobado que temperaturas no excesivamente elevadas permiten el desarrollo de estos patógenos.

Respecto al pH, el rango óptimo de crecimiento se sitúa en 6-7, pero como en el caso de la temperatura el rango se amplía desde 4,4 hasta 10 (Yates, 2011), e incluso algunos autores han demostrado que algunas cepas STEC son capaces de sobrevivir durante algunas horas a valores de pH de 2,5 – 3 (Molina et al., 2003). También se ha visto que *E. coli* O157:H7 tolera mejor las condiciones de acidez cuando se encuentra en fase estacionaria o cuando no tiene suficientes nutrientes durante la fase logarítmica (Arnold & Kaspar, 1995). Sin embargo, el efecto del pH en la supervivencia de *E. coli* depende del tipo de ácido presente en el medio, así como de la propia cepa (Yates, 2011). Pocos estudios han analizado la influencia de este parámetro en el desarrollo de cepas EPEC, pero en nuestro caso hemos comprobado que tanto las cepas EPEC como las STEC son capaces de tolerar un pH de 5,5 cuando el ácido empleado es el ácido láctico y un pH de 2,37 cuando se emplea ácido clorhídrico. Resultado esperable porque los ácidos orgánicos son más eficaces que los inorgánicos. Otro resultado interesante es que el ácido láctico tiene un efecto inhibitorio ligeramente superior en el caso de las cepas STEC respecto a las cepas EPEC. Estos datos concuerdan con lo señalado por Gordon y Small (1993) quienes observaron que los patotipos enteroinvasivo y enteropatogénico de *E. coli* son significativamente más tolerantes a la acidez que las variedades no patógenas. La tolerancia a la acidez es una característica que presentan algunas cepas de bacterias patógenas como *Salmonella*, que les permite mejorar significativamente su supervivencia en alimentos ácidos y a lo largo del tracto digestivo, consiguiendo con ello llegar a colonizar el intestino y originar los síntomas asociados a la infección (Leyer et al., 1995).

Los datos disponibles acerca de la mínima  $a_w$  que permite el crecimiento de *E. coli* están en torno a 0,95, o un 8 % de NaCl, siendo el valor óptimo de 0,995  $a_w$  (OMS, 2011), pero si las condiciones de temperatura o pH están por debajo de los valores óptimos, la  $a_w$  necesaria para el crecimiento de *E. coli* es superior (Yates, 2011). Además, en nuestros ensayos, como era de esperar, encontramos que la mínima  $a_w$  que toleran las cepas depende del compuesto utilizado para disminuirla. Así, cuando se emplea NaCl, por debajo de 0,94  $a_w$  se mueren prácticamente todas las células, pero si empleamos glicerol, a  $a_w$  de 0,93 e incluso 0,91 observamos supervivencia de algunas de ellas. Cuando empleamos sacarosa para modificar la  $a_w$  no se observa una

---

tendencia clara ya que la cepa L6 es capaz de sobrevivir bien a  $a_w$  de 0,93, pero con las otras dos cepas, L29a y L50 se observa lo contrario, incluso a una  $a_w$  relativamente alta, como es 0,96, prácticamente no sobreviven.

Algunos autores sugieren que, en general, el efecto de NaCl, KCl y otros solutos es mayor que el del glicerol. Esto se explica porque cuando disminuye la  $a_w$  del medio en dónde se encuentran las bacterias, en éstas tienen lugar una serie de fenómenos cuyo objetivo es prevenir la plasmólisis. Entre estos fenómenos se encuentra la acumulación de un aminoácido; si éste es el glutamato, al alcanzar el interior de la célula una  $a_w$  de 0,95, la concentración de iones potasio es tan alta que cesa el crecimiento. Sin embargo, si se acumula prolina las bacterias pueden crecer a valores más bajos de  $a_w$  porque éste aminoácido reduce la  $a_w$  interna de la célula sin que se vea afectada la actividad enzimática y sin el consiguiente acúmulo de tóxicos. El glicerol no es sintetizado por la célula bacteriana pero, si se encuentra en el medio, puede acceder al interior de la misma y actuar como la prolina (solute compatible) (Sperber, 1983), lo cual podría explicar que nuestras cepas sobrevivan a valores de  $a_w$  tan bajos como 0,91 cuando el soluto empleado para disminuirla es el glicerol.

En la industria alimentaria, la modificación de varios parámetros sirve para controlar la proliferación de los microorganismos en los alimentos, pero en ocasiones, debido a fallos en el proceso de elaboración o a unas malas condiciones higiénicas, la contaminación de diversos tipos de alimentos, entre los que se incluyen los productos lácteos, han ocasionado importantes brotes clínicos. Como se ha comprobado en este trabajo las cepas de *E. coli*, tanto EPEC como STEC, son capaces de sobrevivir algunos días en el yogurt y en la cuajada, a pesar de mantenerse estos alimentos a bajas temperaturas.

En la cuajada hemos observado que independientemente del inóculo inicial de *E. coli* y de si se trata de cepas EPEC o de STEC, algunas células son capaces de sobrevivir durante toda la vida útil de este alimento almacenado a 4 °C. Llama la atención la elevada concentración de células tanto EPEC como STEC que se observa en la etapa inicial del periodo de almacenamiento, posiblemente ocasionada por el crecimiento durante la elaboración, y aunque los recuentos obtenidos a partir del

tercer día de almacenamiento a 4 °C disminuyan hasta 2-3 log ufc/g, se sabe que las dosis infectivas para el patotipo EHEC se sitúan entre 10 y 100 células (AESAN, 2012), por lo cual, una contaminación de este alimento con estos tipos de *E. coli* supone un riesgo para la población. Con respecto al pH, sus valores se mantienen entre 6,6 y 6,8 sin que se observe ninguna relación con la evolución de los microorganismos patógenos.

En el yogurt, observamos que la supervivencia de los dos patotipos de *E. coli* estudiados es menor que en el caso de la cuajada. En este caso los recuentos no aumentan durante la etapa de fabricación, lo cual podría ser debido a una competición con el cultivo iniciador. Los recuentos de EPEC en el caso del inóculo más elevado van disminuyendo desde el proceso final de fermentación en el que se detectan 4,6 log ufc/g hasta detectar 3 log ufc/g transcurridos 7 días y no detectándose a los 15 días. Resultados similares se obtuvieron con las cepas STEC, aunque se observó que son ligeramente más resistentes. Tras la fermentación se detectaron recuentos de 4,5 log ufc/g que disminuyeron hasta 1 log ufc/g transcurridos 15 días. Al final del periodo de vida útil del producto no se detectó ninguno de los dos patotipos de *E. coli*. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en estudios anteriores. Hudson et al. (1997) detectaron que la población de *E. coli* O157 descendía desde 7,7 log ufc/g hasta 1,4 log ufc/g en tan solo ocho días de almacenamiento a 4 °C. Partiendo de una concentración de *E. coli* O157 al inicio del proceso de almacenamiento más similar a la empleada en nuestro trabajo, Quinto et al. (1999) observaron también un descenso rápido en la población de este microorganismo en los 6 primeros días de almacenamiento a 4 °C. Las pequeñas diferencias en cuanto a la mayor supervivencia a los largo del tiempo que se han observado en nuestro trabajo respecto a éste último puede deberse a los valores de pH del producto, ya que en nuestro caso fluctúa entre 4,1 y 4,4 a lo largo de todo el periodo de almacenamiento y en el trabajo de Quinto et al. (1999) se sitúa entre 3,9 y 4,3, por lo que el pH ligeramente más ácido puede contribuir a aumentar la inactivación. A pesar de no detectarse las cepas inoculadas al finalizar la vida útil del yogurt, y de estar en bajas concentraciones en el caso de la cuajada, se ha comprobado que es capaz de sobrevivir a 4 °C y a pH bastante ácidos durante un periodo de tiempo suficiente para causar enfermedad en los seres humanos en el caso

---

de ingerir estos alimentos contaminados, por lo que se debería de evitar o minimizar la contaminación de la materia prima y mantener las máximas condiciones higiénicas durante todo el proceso de fabricación.

La menor supervivencia de las cepas de *E. coli* tanto EPEC como STEC en el yogurt respecto a la cuajada se puede deber, como ya se ha comentado, a la influencia de parámetros físico-químicos como el pH, que en el yogurt es menor que en la cuajada, a la concentración de ácido láctico, que como era de esperar, aumenta a lo largo del periodo de almacenamiento en el caso del yogurt, y a otros inhibidores producidos por la bacterias ácido lácticas presentes en este producto.

En las industrias lácteas se han identificado una serie de problemas que podrían facilitar la presencia de éstos microorganismos patógenos en los alimentos como son una inadecuada pasteurización de la leche, o una contaminación posterior a la pasteurización debida al empleo inadecuado de sistemas de limpieza o por una contaminación cruzada debida a la proximidad de una granja en la que existan animales portadores. Si a esto le añadimos el corto periodo de conservación que suelen presentar los derivados lácteos estudiados, y tenemos en cuenta cómo afectan los parámetros analizados en este capítulo al crecimiento de estas bacterias, se debe tener especial cuidado en la fabricación de productos lácteos elaborados con leche cruda con el fin de reducir el riesgo asociado a la presencia de estos patógenos en la materia prima (Morgan et al., 1993b).

## **BIBLIOGRAFÍA.**

AESAN, 2012. 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/ productores de toxinas Shiga/ enterohemorrágicos (VTEC/ STEC/ EHEC). Revista del Comité Científico. 16, 71.

- Alais, C., 1985. Desarrollo y acción de los microorganismos de la leche. Ciencia de la leche. Principios de técnica lechera. Reverté S.A., Barcelona, España.
- Anónimo, 2007. Real Decreto 1070/2007, de 27 de Julio de 2007, por el que se aprueba la norma de calidad de la cuajada. (B.O.E. 29.08.2007). B.O.E. 207, 35985.
- Anónimo, 2014. Real Decreto 271/2014, de 11 de abril, por el que se aprueba la Norma de Calidad para el yogur o yoghurt. (B.O.E. 18.04.2014). B.O.E. 102, 33154.
- Arnold, K. W., Kaspar, C. W., 1995. "Starvation- and stationary-phase-induced acid tolerance in *Escherichia coli* O157:H7". Applied and Environmental Microbiology.61, 2037-2039.
- Arocha, M., McVey, M., Loder, S., Rupnow, J., Bullerman, L. 1992. "Behavior of hemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 during the manufacture of cottage cheese". Journal of Food Protection. 55.
- Casado Cimiano, P., García Álvarez, J. A., 1986. Mamitis y calidad de la leche. Hojas Divulgadoras del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid, España.
- Chen, C., 1989. "Water activity–concentration models for solutions of sugars, salts and acids". Journal of Food Science. 54, 1318-1321.
- Conner, D. E., Kotrola, J. S., 1995. "Growth and survival of *Escherichia coli* O157: H7 under acidic conditions". Applied and Environmental Microbiology. 61, 382-385.
- De Vuyst, L., Vandamme, E. J., 1992. "Influence of the carbon source on nisin production in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* batch fermentations". Journal of General Microbiology. 138, 571-578.

- 
- Dineen, S. S., Takeuchi, K., Soudah, J. E., Boor, K. J., 1998. "Persistence of *Escherichia coli* O157: H7 in dairy fermentation systems". Journal of Food Protection. 61, 1602-1608.
- FAO, 2013. "Food Outlook. Biannual Report on Global Food Markets". Noviembre 2013.
- Farrokh, C., Jordan, K., Auvray, F., Glass, K., Oppegaard, H., Raynaud, S., Thevenot, D., Condron, R., De Reu, K., Govaris, A., Heggum, K., Heyndrickx, M., Hummerjohann, J., Lindsay, D., Mischczycha, S., Moussiegt, S., Verstraete, K., Cerf, O., 2013. "Review of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and their significance in dairy production". International Journal of Food Microbiology. 162, 190-212.
- Glass, K. A., Loeffelholz, J. M., Ford, J. P., Doyle, M. P., 1992. "Fate of *Escherichia coli* O157:H7 as affected by pH or sodium chloride and in fermented, dry sausage". Applied and Environmental Microbiology. 58, 2513-2516.
- Gorden, J., Small, P.L., 1993. "Acid resistance in enteric bacteria". Infection and Immunity. 61, 364-367.
- Kauppi, K., Tatini, S., Harrell, F., Feng, P., 1996. "Influence of substrate and low temperature on growth and survival of verotoxigenic *Escherichia coli*". Food Microbiology. 13, 397-405.
- Leyer, G. J., Wang, L. L., Johnson, E. A., 1995. "Acid adaptation of *Escherichia coli* O157:H7 increases survival in acidic foods". Applied and Environmental Microbiology. 61, 3752-3755.
- Madrid, A., 1996. Curso de Industrial Lácteas. Mundi-Prensa Libros, S. A., Madrid.
- Molina, P. M., Parma, A. E., Sanz, M. E., 2003. "Survival in acidic and alcoholic medium of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157: H7 and non-O157: H7 isolated in Argentina". BMC Microbiology. 3, 17.

- Morgan, D., Newman, C., Hutchinson, D., Walker, A., Rowe, B., Majid, F., 1993. "Verotoxin producing *Escherichia coli* O 157 infections associated with the consumption of yoghurt". *Epidemiology and Infection*. 111, 181-188.
- OMS, 2011. "Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC)". Organización Mundial de la Salud. Nota descriptiva 125.
- Parlamento Europeo, 2004. REGLAMENTO (CE) Nº 853/2004 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 29 de abril de 2004 por el que se establecen normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal. (DO L 139 de 30.4.2004, p. 55). p. 55.
- Quinto, E., Bachrouri, M., Roig, A., Mora, M., 1999. Evolución de *Escherichia coli* enterohemorrágico en yogur comercial". *Alimentaria*. 33-35.
- Sperber, W. H., 1983. "Influence of water activity on foodborne bacteria - A Review". *Journal of Food Protection*. 46, 142-150.
- Steele, B., Murphy, N., Arbus, G., Rance, C., 1982. "An outbreak of hemolytic uremic syndrome associated with ingestion of fresh apple juice". *Journal of Pediatrics* 101, 963-965.
- Strawn, L. K., Danyluk, M. D., 2010. "Fate of *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella* spp. on fresh and frozen cut mangoes and papayas". *International Journal of Food Microbiology*. 138, 78-84.
- Vidovic, S., Mangalappalli-Illathu, A. K., Korber, D. R., 2011. "Prolonged cold stress response of *Escherichia coli* O157 and the role of rpoS". *International Journal of Food Microbiology*. 146, 163-169.
- Yates, A., 2011. "Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC)". En Craig, D. and Bartholomaeus, A. (Eds) "Agents of Foodborne Illness. Food Standards Australia New Zealand". Canberra, Australia.

---

Zhao, T., Doyle, M., Besser, R., 1993. "Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 in apple cider with and without preservatives". *Applied and Environmental Microbiology*. 59, 2526-2530.



**CONCLUSIONES.**



**PRIMERA.** La leche de cabra obtenida en explotaciones caprinas de la Comunidad Autónoma de Castilla y León presenta una calidad higiénica acorde con las exigencias de la legislación europea. No parece suponer un riesgo en la transmisión de *Cronobacter sakazakii*. Sin embargo, la presencia de tipos patógenos de *Escherichia coli* es preocupante y sería necesario tenerla en cuenta para implantar medidas de control.

**SEGUNDA.** Las cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas a partir de muestras de leche de cabra no presentan grandes diferencias fenotípicas pero sí una gran diversidad genotípica entre ellas, como se pone de manifiesto mediante el empleo de la técnica de Electroforesis en Gel de Campo Pulsado. Estas diferencias son posiblemente debidas a la distancia geográfica entre las explotaciones muestreadas.

**TERCERA.** La presencia, en leche de cabra, de cepas de *Staphylococcus aureus* potencialmente productoras de enterotoxinas podría suponer un riesgo si se dieran las condiciones para su multiplicación y para la producción de enterotoxinas como podría ser un fallo en la cadena del frío.

**CUARTA.** La presencia de cepas de *Escherichia coli* de los patotipos EPEC y STEC en muestras de leche de cabra supone un riesgo significativo cuando se utiliza leche cruda o cuando no se aplican correctamente los tratamientos térmicos adecuados. También es preocupante la posible contaminación cruzada que podría tener lugar durante los procesos de elaboración de los productos lácteos derivados de leche de cabra.

**QUINTA.** Se ha encontrado una relación genética entre cepas de EPEC y de STEC aisladas de los mismos hábitats, que podría conducir a la aparición de cepas con nuevas características de patogenicidad.

**SEXTA.** Los datos obtenidos acerca del comportamiento de las cepas de *Escherichia coli* ensayados junto con las bajas dosis infectivas sugiere que es muy importante tanto la conservación de la leche de cabra como la de sus productos derivados a temperaturas inferiores a 8 °C.

**SÉPTIMA.** Algunas cepas patógenas de *E. coli* estudiadas son capaces de sobrevivir a valores de pH de 2,37 cuando en el medio está presente ácido clorhídrico, y a pH 5,5 cuando se trata de ácido láctico. Además, también toleran valores de  $a_w$  de 0,91 cuando el soluto empleado es el glicerol, pero cuando se utiliza NaCl, la  $a_w$  que toleran se sitúa por encima de 0,94 y es de 0,93 si la sacarosa es el soluto empleado.

**OCTAVA.** Dado que algunas células de *Escherichia coli* EPEC y STEC son capaces de sobrevivir durante la vida útil de la cuajada fabricada con leche de cabra y mantenida a 4 °C, es importante la pasteurización de la leche y mantener unas buenas condiciones de higiene durante el proceso de fabricación con el fin de minimizar el riesgo asociado al consumo de este producto lácteo.

**NOVENA.** Las cepas de *Escherichia coli* de los patotipos estudiados son capaces de sobrevivir en yogurt elaborado con leche de cabra durante los primeros 15 días tras la fabricación. Por ello, se deberían adoptar medidas para prevenir su contaminación y evitar así la posible transmisión a los consumidores de estas bacterias.

