



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES DE LA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA.

**DETERMINACIÓN DE LA REACCIÓN CRUZADA DE UN DISPOSITIVO DE
INMUNOCAPTURA PARA LA DETECCIÓN DE E. Coli O157:H7
CON DIFERENTES BACTERIAS.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
P R E S E N T A:
NANCY ALEJANDRA | CHRISTY SANTIAGO

ASESOR: MVZ. MC CECILIA ROSARIO CORTES
MVZ. MC RUBEN MERINO GUZMAN



MÉXICO D.F.

2004



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

A mis padres Carlos Christy y Alejandra Santiago quienes me enseñaron desde pequeña a luchar para alcanzar mis metas.

A mis hermanos Carlos y Alberto quienes siempre me animan a seguir adelante.

De manera muy especial a mi abuelita Maria Luisa Inclán q.e.p.d. Tu recuerdo siempre inolvidable en mi memoria.

A mis abuelitos Adalberto y Cristina; A mis tíos Mark y Zoila; Guillermo y Elia; Jorge y Mine; A mis primos Kendra, Memo, Itzel y Xareni por su cariño y apoyo.

A mi novio Nobuhiko Akachi porque cada día aprendo algo nuevo junto a ti, por tu apoyo, cariño, amor y comprensión incondicional.

A mis amigos de la FMVZ:

Adriana Velázquez, Alma Ruíz, Yovanka Toxqui, Deborah Sades, Tetsuo Akachi, Ricardo González, Jesús Domínguez, Luisangela García, Miriam Plata, Alan Hernández, Victor Vargas, Erick Dávila, Gerardo Bárcena, Silvia Viruela, Lilian Mendoza, Liz Benitez, Norma Azpiroz., Ricardo Badillo, Rafael Ojeda, Adrian Fernández, Lizbeth Herrera, Israel Vega, Alejandro Cabrera, Juan Carlos Mora, Jorge Alva, Ayde Flores, Cesar Camarillo, Rocio Castelán, Berenice García, Ismael Mujica, Juan Manuel Lechuga, Cristian Márquez Guillermo Garrido Por su amistad y por todos los momentos que hemos compartido.

A mis amigos del Departamento de Producción Animal Aves:

Jesús Reyes, Alejandro H. Flores, Claudia Solis, Vianca Hernández, Guillermo Gaona, Lili Bernal, Aida Luna y Juan Carlos Morales de quienes he aprendido muchas cosas.

A mis amigas de la prepa:

Nora Díaz, Sandra Flores, Rebeca Martínez y Elide Fournier.

Por estar conmigo en las buenas y en las malas y por todas las experiencias que hemos vivido y que han hecho crecer nuestra amistad.

A mis increíbles amigos:

Siria Guzmán, Alejandro Pliego, Fernando García, Marifer Nuñez, Arturo Gaytán, Alex López, Alba Rodríguez, Alan Ochoa, Irma Ortiz, Hector Rubio, Aarón Mercado, Sergio Dávila, Diana Mendoza, Maricarmen Gaxiola, Omar Jiménez, Daniel Jiménez, Mauricio Dávila, Jaime Dávila, Javier Vázquez, Omar Vélez, Ivan Salgado, Mariana Morán, George Lamadrid, Fr Héctor Santillán, Daniel, Gutierrez, Francisco Beltrán y Yaranely Rodríguez por esta amistad tan especial. creo que todos sabemos el valor de este sentimiento que nos une y que nos hace mas fuertes. Mil gracias por todo lo que he aprendido de ustedes y con ustedes. Los quiero muchísimo!!!.

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia y Al Departamento de Aves.

A mis padres por su gran ejemplo, por su cariño, apoyo y por la educación que me han brindado. Gracias a ustedes soy lo que soy.

A mis hermanos por ser parte fundamental de lo que soy y por su confianza, cariño y apoyo recibidos. Los quiero!!

A Nobu por tu amor, y apoyo que día a día me ayudan a ser una mejor persona. Por hacerme crecer tanto, por tus consejos en el momento oportuno y por tu amor incondicional, gracias por darme fuerzas suficientes para seguir siempre adelante. Contigo aprendí que si existe la felicidad completa!! , día a día aprendo algo nuevo junto a ti. t amo.

A mi escuela: Instituto Pedagógico Anglo Español

A mis asesores MVZ Rubén Merino y MVZ Cecilia Cortés por apoyarme en la realización de esta tesis, por su apoyo, disposición, enseñanzas, su paciencia y por guiar este proyecto.

A mi jurado: MVZ Alfredo Sahagún, MVZ Gabriela Gómez, MVZ Rigoberto Hernández y MVZ Nestor Ledesma por su tiempo y dedicación.

A los Doctores: Tamas Fehervari, Odette Urquiza, Gabriela Gómez, Juan Carlos Morales, Marco Juárez, Luz María Charles, Carlos López Coello, Luis Fernández de Córdoba y Rigoberto Hernández por brindarme su amistad sincera, por su apoyo, enseñanzas, y por la confianza que tuvieron en mí

A Lili Bernal y Aida Luna por la amistad que tenemos y la cual sigue creciendo, gracias por su apoyo en la realización de mi Tesis. Personas como ustedes son muy pocas.

Adri, Alma. : Mas que unas amigas para mí son como mis hermanas, muchas gracias por su cariño, apoyo, por esta amistad que cada día se hace mas fuerte y por todo los momentos que hemos compartido desde que nos conocemos. las quiero mucho!!

Debby, Yovis: Muchas gracias por esta bella amistad y su apoyo en los momentos difíciles, sin ustedes no sería la misma, las quiero.

Tets, Richo y Chucho: Gracias por estar conmigo siempre que los he necesitado y por todos los momentos que hemos compartido durante tantos años, saben que los quiero mucho y que cuentan conmigo.

Siria, Marifer, Alba y Mariana: No se que haría sin ustedes las quiero mucho y no se como agradecerles lo mucho que han hecho por mí. Día a día somos mas unidas y me demuestran que la amistad es una de las mejores partes de la vida.

Chucho, Clau, Alex, Vianca y Memo: Juntos hemos pasado muchas aventuras y momentos muy padres o muy difíciles que nos han unido y han hecho crecer nuestra amistad muchas gracias !!

Alex Pliego: Por todo lo que hemos vivido y compartido en cada etapa del camino recorrido juntos, por la felicidad y tu apoyo en aquellos momentos difíciles donde solo tu me entendías. Gracias!!

Fernando García: Hermanito gracias por enseñarme que no hay límites, que lo que me proponga lo puedo lograr y que solo depende de mí. Tqm.

Arturo Gaytán: Eres uno de los mejores amigos que cualquier persona desearía tener a su lado, gracias por todo lo que me has enseñado!!

Gracias a todos ustedes por su apoyo, amistad, cariño, comprensión, por todos esos momentos llenos de alegría y magia que hemos compartido en todos estos años. De todos ustedes he aprendido muchas cosas que me han hecho crecer y ser una mejor persona. Saben lo especiales que son para mí y lo mucho que los quiero.

Con mucho cariño

Nans.

CONTENIDO

	<u>Página</u>
RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	3
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	12
MATERIAL Y METODOS.....	13
RESULTADOS.....	18
DISCUSIÓN.....	22
CONCLUSIÓN.....	27
LITERATURA CITADA.....	28

RESUMEN

CHRISTY SANTIAGO NANCY ALEJANDRA. Determinación de la reacción cruzada de un dispositivo de inmunocaptura para la detección de *E. coli* O157:H7 con diferentes bacterias. (Bajo la dirección de: Cecilia Rosario Cortés y Rubén Merino Guzmán).

El presente estudio se realizó en el Departamento de Producción Animal: Aves de la FMVZ de la UNAM para evaluar la especificidad de un dispositivo de inmunocaptura para *E. coli* O157:H7 Reveal®. En la primera fase del estudio se probaron los siguientes medios de cultivo: Caldo dextrosa, Caldo Infusión Cerebro Corazón, Caldo lactosa, Caldo nutritivo, Caldo selenito, Caldo de soya tripticaseína, Caldo tetrionato, Caldo triptosa y Caldo triptosa fosfato; con la finalidad de encontrar un medio de cultivo alternativo al recomendado por el fabricante. Cada medio fue inoculado con diferentes concentraciones bacterianas de una cepa O157:H7, obtenida del Departamento de Salud Pública de la F.M. de la UNAM. Todos los tubos fueron incubados, inactivados y se colocaron en el Reveal®, en donde los medios Triptosa Fosfato, Triptosa y CICC dieron positivos a partir de 100 UFC, por lo cual el CICC fue seleccionado para realizar la segunda fase del experimento. En esta segunda fase las cepas *E. coli* O116:H10, *E. coli* O7:K1, *Enterobacter* spp., *Enterobacter cloacae*, *Salmonella* spp., *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Citrobacter* spp., *Citrobacter freundii*, *Yersinia* spp., *Vibrio cholerae*, *Salmonella thyphi* y *E. coli* O157:NM, fueron ajustadas a concentraciones de 10^1 - 10^8 , inactivadas y probadas en el Reveal®. Un resultado positivo se observó en O157:H7 y *E. coli* O157:NM y un resultado negativo se observó en el resto de las bacterias. En este estudio se demostró que la prueba Reveal® para la detección de *E. coli* O157:H7 no presentó reacción cruzada con diferentes bacterias.

SUMMARY

CHRISTY SANTIAGO NANCY ALEJANDRA. Cross-reaction determination in a *E. coli* O157:H7 immunocapture dispositive with other bacteria. (Directed by Cecilia Rosario Cortés and Rubén Merino Guzmán).

This study was realized in the Poultry Department at the FMVZ ,UNAM to evaluate the Reveal® immunocapture dispositive specificity for *E. coli* O157:H7. In the first phase the following growth mediums were tested: dextrose broth, brain-heart infusion broth, lactose broth, nutritive broth, selenite broth, trypticase soy broth, tetrastionate broth, triptose broth, and triptose phosphate broth. The purpose of this test was to find an alternative medium. Each sample was inoculated with different bacterial concentration of *E. coli* O157:H7 obtained from FM UNAM.

All the samples were incubated, inactivated and tested with Reveal® to examine the possibility of a cross-reaction.

With 100 UFC Triptose broth, triptose phosphate broth and brain-heart infusion presented a growth.

Brain-heart infusion was selected for the second phase in wich *E. coli* O116:H10, *E. coli* O7:K1, *Enterobacter* spp., *enterobacter cloacae*, *salmonella* spp., *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Citrobacter* spp., *Citrobacter freundii*, *Yersinia* spp., *Vibrio cholerae*, *Salmonella thyphi* and *E. coli* O157:NM were tested with reveal. A positive result was obtained with *E. coli* O157:H7 and *E. coli* O157:NM. And a negative result was obtained with the other bacterials.

In this study Reveal® did not present a cross reaction with the bacteria tested.

INTRODUCCION

Escherichia coli es un bacilo Gram. negativo, anaerobio facultativo, no esporulado que mide 2-3 x 0.6 micras.¹ Algunas cepas forman cápsula y la mayoría son móviles y poseen flagelos peritricos, Las colonias que produce *E. coli* son circulares, convexas y lisas, blancas o blanco-amarillentas, de aspecto húmedo y translúcidas.²

E. coli, forma ácido y gas con rapidez a partir de la lactosa, reduce fuertemente los nitratos a nitritos y amoníaco, son positivas en las pruebas de indol, rojo de metilo y manitol, así como negativas a oxidasa, urea y citrato; su temperatura óptima de crecimiento es de 30-37°C en pH de 7-7.2, y pueden morir cuando la temperatura aumenta a 60°C durante 15-30 minutos.^{1,2}

Este microorganismo, es considerado un representante de la microbiota comensal normal de la porción distal del tracto intestinal de las personas y de animales como vacas, cerdos, ovejas y aves.^{3,4}

Es una bacteria con una estructura antigénica compleja y contiene 167 antígenos somáticos (O), 53 flagelares (H) y 74 capsulares (K) de utilidad taxonómica⁵. Sin embargo, solo un número reducido de cepas de *E. coli* han sido relacionadas con enfermedades clínicas.⁴ Entre las características que confieren virulencia se encuentran la producción de colicinas, hemolisinas, enterotoxinas, además de la resistencia a algunos antibióticos, metales pesados y luz ultravioleta.⁶

En los humanos se han identificado al menos 5 grupos patógenos de *E. coli* productores de diarrea:

- 1) Enteropatógena (EPEC).
- 2) Enterotoxigénica (ETEC).

- 3) Enteroinvasiva (EIEC).
- 4) Enteroagregativa (EAEC).
- 5) Enterohemorrágica (EHEC).

Estas categorías están basadas en distintas propiedades de virulencia, diferentes interacciones con la mucosa intestinal y distintas combinaciones de antígenos O:H. ^{7,8}

Las cepas EPEC se adhieren a las células de la mucosa intestinal para provocar daño en la estructura celular de la mucosa (adherencia y esfacelamiento).

Las cepas ETEC se adhieren al intestino delgado, y producen al menos una toxina; ya sea la termoestable (ST) o la termolábil (LT), las cuales se asocian al cuadro diarreico. A pesar de que los receptores funcionales de ST han sido identificados en el tracto intestinal de las aves, los serotipos ETEC asociados con la diarrea en humanos no se aíslan frecuentemente a partir de pollos. ⁹

El grupo EIEC se encuentra relacionado bioquímica y genéticamente con las cepas de *Shigella*, ambas invaden las células del colon y se propagan de una célula a otra de manera lateral. Sus hospederos naturales son los humanos y los primates superiores, sin embargo, recientemente se ha reportado la detección de cepas EIEC en aves con infección del saco vitelino. ¹⁰

Las cepas EAEC se fijan a las células del intestino delgado y producen toxinas, pero a diferencia de las cepas EPEC, no alteran la estructura celular de los enterocitos. ^{11,12,13}

El grupo EHEC fue detectado en 1982 por el Centro para Control y Prevención de Enfermedades (CDC) del gobierno de los Estados Unidos a partir de dos brotes de diarrea sanguinolenta severa asociados a la ingestión de alimentos en una cadena de restaurantes de comida rápida. A partir de estos casos se detectó la cepa de *E. coli* perteneciente al serotipo O157:H7; el cual es el más representativo dentro de las cepas EHEC. ¹⁴

Diferentes estudios han reportado que se requieren menos de diez células EHEC para causar enfermedad en humanos, por lo que este grupo es considerado altamente virulento.^{7,8,11,12,15,16} A pesar de que se desconoce el origen de estas cepas, se cree que surgieron de una cepa EPEC a la que un bacteriófago le confirió la capacidad de producir una toxina conocida como Shiga-like toxin (SLT). Las cepas EHEC se fijan y destruyen las células de la mucosa mediante la toxina SLT, también llamada verotoxina, asociada al Síndrome Urémico Hemolítico (HUS, por sus siglas en inglés). Existen dos tipos de SLT: las SLT-I (VT1) y SLT-II (VT2) con algunas variantes como SLTIIIe, producida por las cepas que causan la enfermedad del edema en el cerdo. La presencia de los genes *stII* y *stIII* no es suficiente para conferir patogenicidad, ya que se requieren otros genes de virulencia para adherirse y causar daño a las células intestinales.¹⁷ Algunos de estos factores de virulencia identificados en los serotipos patógenos incluyen la presencia de adhesinas o factores de colonización, la capacidad para invadir las células epiteliales del intestino delgado, la producción de hemolisinas y toxinas.^{8,11,13}

Las toxinas SLT ejercen su acción sobre las células endoteliales de los vasos sanguíneos y glomerulares; así como en las células epiteliales del íleon y colon. También actúan sobre los glóbulos rojos que presentan en su membrana el grupo glicolipídico P1. La SLT ejerce su efecto sobre las células uniéndose específicamente a glicolípidos que actúan como receptores de membrana específicos.¹¹

El bovino es el principal reservorio de *E. coli* O157: H7, aunque otros animales como ovinos, porcinos y pollos también pueden actuar como reservorios de las cepas EHEC. La diseminación de bacterias contaminantes durante el sacrificio de estos animales, es considerada como la primera ruta por la cual EHEC pueden contaminar la carne, debido a las prácticas poco higiénicas durante el sacrificio o la evisceración. Los centros

internacionales de control de calidad como el CENAN (Centro Nacional de Alimentación y Nutrición). han enfocado su atención en las hamburguesas debido a que estas son preparadas con carne molida obtenida de distintos animales. Por ejemplo, si la contaminación ocurre a partir de un solo animal, el molido dispersará la bacteria en ocho toneladas del producto cárnico.¹⁸ Adicionalmente se han detectado otras fuentes de las cepas EHEC, como en embutidos fermentados, leche cruda, yogures artesanales, mayonesa, sidra de manzana, leche mastítica; o productos fabricados con este tipo de leche.¹⁹

Los brotes que han involucrado alimentos ácidos demuestran la tolerancia de las cepas EHEC al pH bajo. Particularmente O157:H7 tolera condiciones de acidez más bajas (pH 2) que otros miembros de la familia, por lo cual puede permanecer viable después de pasar a través del estómago.¹⁷

Estos microorganismos también han sido aislados de productos vegetales, los que pueden contaminarse debido al uso de abonos orgánicos de origen bovino. El agua también ha sido considerada como vehículo de transmisión; ya que se han presentado brotes asociados a la ingestión de agua de bebida no clorada, o por el uso de albercas o lagos contaminados. Las infecciones de *E. coli* se transmiten principalmente por 3 vías:

- 1- Alimentos contaminados
- 2- Directamente de los animales
- 3- Propagación de persona a persona¹⁹

Un aspecto importante que contribuye a que el ganado vacuno sea el reservorio más importante de las cepas EHEC es que a pesar de que el rumen proporciona un ambiente limitante para el crecimiento de estos microorganismos, el ciego y el colon presentan condiciones propicias para su desarrollo.²⁰

En diferentes países se ha determinado que las aves domésticas pueden ser susceptibles a la colonización con *E. coli* O157:H7.^{21,22} En un estudio realizado por Schmidt y Karch. (2000), se observó que las cepas EHEC pueden infectar entre el 6 y 16% de las palomas; mientras que en Escocia la infección del ganado bovino se ha ligado al contacto con el ganso, lo que convierte a estas aves en un reservorio natural.²³

La fase diarreica de la infección causada por *E. coli* O157:H7 en humanos, suele ser autolimitante;²⁴ sin embargo, se ha observado que hasta un 10% de los enfermos infectados con cepas EHEC presentan HUS, lo que puede causar la muerte de esos individuos.²⁵ Algunos investigadores indican que O157:H7, es la causa del 85 al 95% de casos de HUS en Norteamérica y que los EHEC que no pertenecen al serotipo O157:H7 son responsables de un 5 a un 15% de estos episodios.²⁶

El serotipo O157:H7, ha provocado numerosos brotes de colitis hemorrágica en EU, Canadá, el Reino Unido y Japón, en humanos y estos se han incrementado recientemente.¹

En el Centro de Control y Prevención de Enfermedades de los EU, consideran tres hipótesis para explicar la reciente aparición de estas variedades patógenas:

- 1) Que las condiciones para la transmisión de la cepa O157:H7 de animales al hombre hayan existido siempre, pero este agente haya emergido recientemente en la población animal.
- 2) Que la cepa O157:H7 haya estado siempre presente en la población animal, pero que los cambios en las prácticas de procesamiento de la carne y de sacrificio de animales hayan favorecido la contaminación de la carne con esta bacteria.
- 3) Que los cambios en las prácticas del consumidor durante las últimas décadas hayan aumentado la probabilidad de la llegada al hombre de una cepa de *E. coli* O157:H7 que siempre estuvo presente en los reservorios animales.²⁷

La detección e identificación de EHEC es difícil, a pesar de que se encuentra ampliamente distribuida en humanos y animales en varios países. Uno de los métodos de diagnóstico más importantes es la serotipificación. La determinación de los antígenos O y H se realiza por técnicas de aglutinación, mientras que la identificación del antígeno K se da por contraelectroforesis. Sin embargo, se han detectado numerosas reacciones cruzadas entre los antígenos O y K de diferentes cepas de *E. coli* y con los antígenos de otras enterobacterias, por lo que en algunas ocasiones se pueden presentar resultados falsos positivos. Por ello es muy importante emplear antiseros adsorbidos para evitar falsas reacciones de aglutinación.¹⁸ También se han utilizado para el diagnóstico algunas características bioquímicas de las cepas EHEC. El serotipo O157:H7, a diferencia de la mayoría (> 90%) de las cepas de *E. coli*, no fermenta el sorbitol y es Beta -glucuronidasa negativo. Además, crece en presencia de telurito y cefixima. Basándose en estas propiedades se ha desarrollado el medio MacConkey-sorbitol con telurito y cefixima para el aislamiento de cepas EHEC (CT-SMAC) Sin embargo, se han encontrado algunas cepas que no son capaces de crecer en presencia de telurito y cefixima.^{18,28}

Para poder detectar a todas las cepas EHEC O157:H7 se precisa investigar la producción de SLT por técnicas como citotoxicidad en células Vero, hibridación, Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) o pruebas de inmunoensayo enzimático.¹⁸

Estas técnicas de diagnóstico utilizadas para la detección de las cepas EHEC en alimentos se han agrupado en tres categorías:

- 1) ELISA para detectar el antígeno O157.^{29,30}
- 2) Pruebas de hibridación con sondas para SLT1 y SLT2.^{31,32}
- 3) Ensayos en células Vero para detectar la presencia de SLT (citotoxicidad neutralizable con antiseros anti-SLT1 o anti-SLT2) directamente en alimentos.³³

Wright et al., (1994) introdujeron la separación inmunomagnética (SIM)^{34,35} para la detección del antígeno O157 y se ha adaptado al PCR para la detección de los genes que codifican para las toxinas SLT1 y SLT2.³⁶

Actualmente se considera que el mejor método para detectar el serotipo O157:H7 en muestras de animales y alimentos es la SIM, mientras que la técnica de PCR (genes *slt1* y *slt2*) es la técnica más adecuada para realizar la detección de los EHEC no-O157.³⁷

La SIM consiste en el empleo de un caldo de enriquecimiento adecuado (agua de peptona con vancomicina, cefixima y cefsulodin incubado a 37°C durante 6 horas, ó caldo mEC con novobiocina incubado a 41°C durante 18 horas antes de la SIM y posteriormente sembrar el inmunoconcentrado en agar MacConkey sorbitol con (CT-SMAC) y sin (SMAC) telurito y cefixima.³⁸

En algunos estudios en los que se emplean técnicas inmunológicas y genéticas muy sensibles, se ha demostrado que alimentos asociados con brotes graves causados por EHEC pueden contener menos de 10 bacterias O157:H7 por gramo, hecho que dificulta mucho su detección; por ejemplo, Padhey y Doyle (1991), utilizaron la técnica ELISA con un antisuero policlonal contra el antígeno O157 y observaron reacciones positivas en 3 (3%) de 107 muestras de carne molida de vacuno; adicionalmente determinaron que el número más probable de EHEC O157:H7 en las tres muestras oscilaba entre 0.4 y 1.5 bacterias por gramo, mientras que en muchas de las muestras menos del 1% de las *E. coli* presentes eran productoras de SLT.³⁰

La presencia de *E. coli* en alimentos ($> 10^2$ /g) se utiliza para indicar una probable contaminación fecal y la posible presencia de otros microorganismos enteropatógenos como *Salmonella*. Sin embargo, si se considera que *E. coli* puede ser un patógeno importante, las cifras generalmente aceptables adquieren un nuevo significado, ya que la

presencia de solamente una bacteria de O157:H7 por gramo representa un grave riesgo de infección. Se ha realizado una gran cantidad de trabajo para dilucidar los métodos más eficientes para el aislamiento e identificación de las cepas O157:H7, una alternativa ha sido el uso de medios selectivos de enriquecimiento y de siembra en placa empleando perlas inmunomagnéticas para la captura selectiva de este microorganismo.¹⁸ Los sistemas de inmunocaptura son una opción importante ya que representan varias ventajas, el sistema de inmunocaptura Reveal®, ofrece una detección rápida de *E. coli* O157:H7. El sistema utiliza varios medios de enriquecimiento, nutrientes y otros factores necesarios para el mantenimiento y rápido crecimiento de esta bacteria.

En la técnica de inmunocaptura se lleva a cabo la incubación de la muestra en un caldo de enriquecimiento, posteriormente se inactiva el cultivo y se deposita en un dispositivo en el cual la muestra se difunde hacia una zona de reacción que contiene anticuerpos anti-*E. coli* O157 conjugados con partículas de oro coloidal. Si el antígeno está presente en la muestra, se une a los anticuerpos conjugados con oro. Los complejos antígeno-anticuerpo se difunden a través de una membrana de celulosa que contiene una zona de anticuerpos anti-*E. coli* O157. El complejo inmune con oro conjugado forma agregados en esta zona, hasta crear una línea visible. El resto de la muestra continúa su migración hacia el extremo de la membrana.³⁹ A pesar de que se considera que los métodos de inmunocaptura son altamente específicos para el aislamiento de *E. coli* O157, existe la posibilidad de fallas en el sistema por reconocimientos no específicos. El dispositivo Reveal® señala que su sistema posee una alta sensibilidad (99.9%) y especificidad (99.4%) en relación con otros sistemas de inmunocaptura. Sin embargo, existen reportes de reacciones cruzadas de *E. coli* O157:H7 con *Yersinia enterocolitica*,¹⁸ *Citrobacter freundii*,⁴⁸ *Brucella abortus*,¹⁸ *Escherichia hermannii*¹⁸. Mientras que Navarro et al., (2003), demostraron que existe una reacción

cruzada entre las cepas O157:H7 y algunos otros serotipos de *E. coli* como son O116 y O7.

15

En México aún no se ha reportado la presencia del serotipo O157:H7, sin embargo, los dispositivos para su detección son utilizados rutinariamente en carne de origen nacional e importada de Estados Unidos, donde esta bacteria ha causado la muerte de personas; por lo que existe la necesidad de realizar un monitoreo constante en los productos cárnicos que se consumen en nuestro país.

Hipótesis

El dispositivo de inmunocaptura Reveal® es específico para la detección de *Escherichia coli* O157: H7, por lo que no se observarán reacciones positivas con otros serotipos de *E. coli* u otros géneros bacterianos.

Objetivos

Determinar cuales medios de cultivo podrían utilizarse como alternativa al caldo de enriquecimiento para la incubación de las muestras previo a la utilización del dispositivo de inmunocaptura (Reveal®)

Evaluar la especificidad de un producto de inmunocaptura (Reveal®) para la detección de *Escherichia coli* O157:H7.

Material y Método

Experimento I:

Esta prueba se llevó cabo con el fin de determinar la posibilidad de utilización de medios alternativos a los recomendados por el fabricante (mEC), para el enriquecimiento que se lleva a cabo en el sistema de Inmunocaptura para *E. coli* O157:H7.

Los medios utilizados fueron los siguientes:

- Caldo dextrosa*
- Caldo infusión cerebro corazón (CICC)*
- Caldo lactosa***
- Caldo nutritivo*
- Caldo selenito*
- Caldo de soya tripticaseína*
- Caldo tetrionato** Caldo triptosa**
- Caldo triptosa fosfato**

Cada uno de los medios de cultivo fue preparado de acuerdo con las recomendaciones de los fabricantes. En tubos de cristal se colocaron 5 ml de medio de cultivo. Se emplearon 6 tubos para cada uno de los caldos, estos fueron inoculados con diferentes concentraciones bacterianas de una cepa *E. coli* O157:H7, obtenida de la colección del laboratorio de Serología del Departamento de Salud Pública de la Facultad de Medicina de la UNAM.¹

*Acumedia manufactures Inc, Baltimore, Maryland 21211.

** Becton Dickinson and company Sporks, Maryland 2152 USA.

*** Merck-México S.A. Edo de méx

Las concentraciones empleadas fueron 10^0 , 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 UFC/ml, mientras que el último tubo no fue inoculado (testigo negativo).

Para ajustar la concentración bacteriana la cepa O157:H7 fue incubada por agitación en 30 ml de CICC, durante 18 horas a 37°C . Posteriormente fue centrifugada a 3000 rpm (1000 x g) durante 15 minutos². Se realizaron dos lavados con una solución amortiguadora de fosfatos (PBS) estéril y se centrifugó nuevamente bajo las mismas condiciones. La concentración bacteriana se ajustó utilizando un espectrofotómetro³ a una longitud de onda de 450 nm y una absorbancia de 1.000, lo cual equivale a una concentración bacteriana de 1×10^9 UFC/ml. A partir de esta concentración, se realizaron 8 diluciones décuples seriadas (10^{-1} – 10^{-8}). Para corroborar la concentración de las suspensiones bacterianas, se sembraron 100 μl de las últimas 3 diluciones (10^{-6} – 10^{-8}) en cajas de Agar de Soya Trypticaseína (TSA). Estas placas se incubaron durante 24 horas a 37°C , y posteriormente se contó el número de colonias desarrolladas en cada una.

Con el fin de simular las condiciones de una muestra de alimento en el que se encuentran presentes diversas especies bacterianas, se cultivó 1 cm^2 de piel de pollo en CICC y fue incubado a 37°C por 18 horas. A partir de este crecimiento se realizaron diluciones décuples seriadas y se determinó que contenía 4×10^8 UFC/ml de bacterias no identificadas. Este cultivo fue probado en el dispositivo Reveal® para corroborar que ninguna de las bacterias presentes en él pudiera dar un resultado positivo. A cada tubo de los diferentes caldos que contenían de 10^4 hasta 10^9 UFC/ml de la cepa de *E. coli* O157:H7 se le adicionaron 100 μl del crecimiento obtenido de la piel de pollo. Todos los tubos

² *Sorvall® RT 6000 D

³ ** Beckman® DU 640B

fueron incubados durante 8 horas a 43°C en un baño María*⁴. Después de lo cual los tubos fueron inactivados por calor durante un minuto en un horno de microondas a la máxima potencia. Una vez que los tubos se enfriaron, se colocaron 5 gotas en el dispositivo Reveal® *E. coli* O157:H7 de acuerdo con las indicaciones del fabricante.

La lectura de los dispositivos se llevó a cabo dentro de los 20 minutos posteriores a la realización de la prueba, ya que cualquier resultado obtenido después de este tiempo no se considera válido.

Un resultado negativo se determina por la formación de una banda en la zona C (control), pero no en la zona T (test); mientras que en un resultado positivo se observa la formación de ambas bandas (T y C), como se muestra en la figura 1.

Esta prueba se realizó por triplicado para corroborar los resultados obtenidos.

Experimento 2:

Para determinar la especificidad del sistema Reveal®, se utilizaron 13 diferentes cepas bacterianas, tres de ellas pertenecientes a distintos serotipos de *E. coli*, y diez a otros géneros bacterianos. Además se incluyó la cepa O157:H7 como testigo positivo.

Todas las cepas fueron obtenidas de la colección del laboratorio de Serología (FM, UNAM) y se muestran en el cuadro 1.

⁴ *Techne Tempette TE-8D

Cuadro 1. Cepas obtenidas de la colección del Laboratorio de Serología del Departamento de Salud Pública de la Facultad de Medicina utilizadas en la evaluación del sistema de inmunocaptura.

CEPA	No. de identificación
<i>E. coli</i> O116:H10	No Identificada
<i>E. coli</i> O7:K1	No identificada
<i>Enterobacter spp.</i>	103473
<i>Enterobacter cloacae</i>	093321
<i>Salmonella spp.</i>	074210
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	97533
<i>Klebsiella oxytoca</i>	97191
<i>Citrobacter spp.</i>	108030
<i>Citrobacter freundii</i>	99063
<i>Yersinia spp.</i>	11996
<i>Vibrio cholerae</i>	087275
<i>Salmonella thyphi</i>	106045
<i>E. coli</i> O157:H7 (Testigo Positivo)	No identificada
<i>E. coli</i> O157:NM (no móvil)	No identificada

Para corroborar la pureza, las cepas fueron sembradas en Agar sangre y Agar McConkey y posteriormente se realizó la identificación bioquímica mediante el sistema VITEK®*⁵. Una vez comprobada la identidad de las cepas, se ajustó la concentración bacteriana a 1×10^9 UFC/ml como se describe en el experimento anterior, y se realizaron ocho diluciones décuples seriadas. Los tubos que contenían de 10^4 a 10^9 UFC/ml fueron inactivados durante un minuto en un horno de microondas a su máxima potencia. Una vez que los tubos se enfriaron, se colocaron 5 gotas en dispositivos Reveal® *E. coli* O157:H7 de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Posteriormente se realizó la lectura de los resultados. Esta prueba se realizó por triplicado.

⁵ *AutoMicrobic System (Vitek AMS; bioMerieux Vitek).

RESULTADOS

Experimento 1.

Los resultados obtenidos para determinar el funcionamiento de cada uno de los medios para la incubación de *E. coli* O157:H7 mostraron que en los caldos triptosa, triptosa fosfato, y CICC se encontró una reacción positiva en el dispositivo Reveal® desde la concentración 10^2 UFC, (Cuadro 2). mientras que en el caldo de Soya Tripticaseina y Caldo lactosa solo se observó reacción positiva desde las concentraciones 10^3 y 10^4 UFC (en ambas)(Cuadro 2). En el caso de los caldos nutritivo, dextrosa, selenito y tetracionato no se observó la formación de bandas en ninguna dilución. Los resultados anteriores muestran que los caldos que pueden ser utilizados para esta prueba de inmunocaptura son triptosa fosfato, triptosa y CICC debido a que aun en concentraciones iniciales tan bajas como 10^2 UFC dieron una buena respuesta.

Cuadro 2. Crecimiento de bacterias en los diferentes medios utilizados.

Resultado negativo: -

Resultado positivo: +

Tubo	1	2	3	4	5	6
Concentración bacteriana (UFC/ml)	10 ⁰	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	0
	1	10	100	1000	10000	0
Triptosa Fosfato	-	-	+	+	+	-
Triptosa	-	-	+	+	+	-
Caldo de Soya Trypticaseina	-	-	-	+	+	-
Caldo Lactosa	-	-	-	+	+	-
Caldo nutritivo	-	-	-	-	-	-
CICC	-	-	+	+	+	-
Dextrosa	-	-	-	-	-	-
Selenito	-	-	-	-	-	-
Tetracionato	-	-	-	-	-	-

Experimento 2.

La identificación bioquímica que se llevó a cabo mostró que las bacterias pertenecían al género y especie indicados. Mientras que la identificación serológica confirmó que las cepas de *E. coli* pertenecían al serogrupo determinado previamente.

Los resultados de los conteos bacterianos realizados y la absorbancia se muestran en el cuadro 3. En el cual se observa que la absorbancia es cercana a uno y también los conteos bacterianos corresponden a las UFC de las diluciones realizadas.

Cuadro 3. Resultados de la absorbancia y de los conteos realizados a partir de las últimas 3 diluciones de las cepas bacterianas.

Cepas	Absorbancia (450 nm)	Numero de colonias (100 µl)		
		10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}
<i>E. coli</i> O116:H10	1.0080	64	8	2
<i>E. coli</i> O7:K1	1.0087	63	10	5
<i>Enterobacter spp.</i>	1.0700	87	12	3
<i>Enterobacter cloacae</i>	1.0120	111	18	5
<i>Salmonella</i>	1.0000	133	26	7
<i>K. pneumoniae</i>	1.0208	95	19	3
<i>K. oxytoca</i>	0.9928	78	12	0
<i>Citrobacter spp.</i>	1.0122	111	15	4
<i>Citrobacter freundii</i>	1.0093	123	21	6
<i>Yersinia spp.</i>	1.0015	115	18	5
<i>Vibrio cholerae</i>	1.0110	101	21	3
<i>Salmonella typhi</i>	1.0030	72	7	0
<i>E. coli</i> O157:H7	1.0102	125	16	0
<i>E. coli</i> O157:NM	1.0195	102	17	0

En la prueba llevada a cabo con las cepas O116 y O7 de *E. coli* y otras bacterias, todos los dispositivos Reveal® mostraron la formación de la banda testigo, lo cual indica que la prueba se llevó a cabo de manera correcta, sin embargo, en ninguna de estas cepas se observó una reacción positiva en el sistema Reveal®. Únicamente en el caso de la cepa O157:NM se observó una reacción positiva similar a la observada en el caso del testigo positivo *E. coli* O157:H7. Inclusive, se encontró que ambas cepas mostraban el mismo resultado en las diluciones (10^4 - 10^8).

DISCUSIÓN

Debido a que la cepa O157:H7, la más representativa del grupo EHEC, es un problema muy importante de salud pública, Johnson (1994)²⁹ señaló la necesidad de utilizar métodos exactos y rápidos para su detección. Bonnie y Bennett (1990)⁴⁰ coinciden en esta necesidad ya que los bovinos son la fuente principal de este agente patógeno, que es transmitido al hombre por el consumo de alimentos contaminados, como carne, leche y los productos que de ellos se derivan. De acuerdo con Ahmed , Connor y Huffman (1995);³⁹ Bennett y Betts (1995);⁴⁰ Weagant, Bryant y Jineman, (1995),⁴¹ el problema de salud que representa el consumo de productos de origen bovino contaminados con O157:H7 ha llevado al desarrollo de métodos rápidos y sensibles, los cuales van dirigidos a la determinación cualitativa del serotipo O157:H7 en los productos cárnicos principalmente, por lo cual en este trabajo se evalúa un dispositivo para su rápida detección.

En el presente estudio se probaron varias concentraciones de diferentes bacterias para evaluar la sensibilidad y especificidad del dispositivo, porque es importante determinar la presencia de *E. coli* O157:H7 debido a que aún en baja cantidad puede causar enfermedad, y por otra parte asegurar que no haya resultados falsos positivos. De acuerdo con Bennet y Betts (1995),⁴⁰ los métodos de aislamiento y diferenciación a partir de alimentos deben tener en cuenta que el microorganismo se puede encontrar en bajas concentraciones (menos de 10 bacterias O157:H7 por gramo) y que las células bacterianas pueden estar afectadas y acompañadas por flora competitiva.

Aunque existen diferentes métodos para detectar a esta bacteria, como el aislamiento, PCR, contrainmunolectroforesis, SIM y sistema de inmunocaptura, de acuerdo con Bennett, y Betts,⁴⁰ no todos ellos poseen la misma sensibilidad y especificidad, tanto para detectar

bajas concentraciones bacterianas como para discriminar entre cepas. De acuerdo con Chapman et al., (1994 y 1997) ^{35,36} el método de PCR es muy confiable pero requiere de la técnica y el conocimiento previo, por lo que varios especialistas coinciden en que el mejor método para detectar el serotipo O157:H7 en muestras y alimentos es la SIM, mientras que la SIM PCR es la técnica más adecuada para realizar la detección de las cepas EHEC no-O157.

En el presente estudio, para seleccionar un medio de cultivo alternativo al recomendado por el fabricante (mEC) para el crecimiento de *E. coli* O157:H7, se sembró la bacteria en varios de ellos. El que mostró mejores resultados fue el CICC y por ello se utilizó para la prueba con las diferentes cepas. Estos resultados coinciden con los de Lina (1992), ⁴² quien realizó un estudio sobre *E. coli* O157:H7 donde utilizó este medio de cultivo para el crecimiento de la bacteria tras considerarlo excelente para su desarrollo, pues es altamente nutritivo para el cultivo de una gran variedad de microorganismos. Inclusive, el Instituto de Salud de Chile (2003), ⁴³ menciona el uso de CICC para cualquier enterobacteria.

En el presente estudio se evaluó el dispositivo de inmunocaptura Reveal® *E. coli* O157:H7 y su diseño es similar al utilizado en las pruebas de embarazo para uso doméstico, el cual se basa en una banda de flujo lateral que utiliza una combinación del anticuerpo específico para la proteína de interés (llamado anticuerpo de captura) y un anticuerpo conjugado que es capaz de generar una reacción colorimétrica (llamado anticuerpo de detección), el cual permite visualizar la presencia de la proteína deseada en la muestra de interés. ⁴⁴

El objetivo de evaluar este dispositivo como alternativa para la detección de *E. coli* O157:H7 surge de los datos del laboratorio fabricante, el cual menciona que, en comparación con otros dispositivos de inmunocaptura, el sistema Reveal® tiene mayores ventajas como son sensibilidad de 99.9%, especificidad del 99.4%, rapidez y sencillez. Esta

información del fabricante coincide con los resultados de este trabajo, ya que se obtuvo buena sensibilidad en el testigo positivo, en el cual detectó la bacteria a partir de concentraciones de 10^4 UFC/ml. En cuanto a la especificidad, no se detectó reacción cruzada con otras bacterias a excepción de O157:NM como se ha reportado en los estudios realizados por Navarro (2003),¹⁵ Nishiuchi (2000),⁴⁸ y Vinogradov (1994).⁴⁹

Los resultados del presente estudio muestran que al probar el dispositivo Reveal® con *Yersinia enterocolitica*, *Citrobacter* spp. y *Citrobacter freundii* fueron negativos, lo cual difiere con los reportes de reacciones cruzadas de *E. coli* O157:H7 con diferentes enterobacterias. Por ejemplo, Navarro (2003)¹⁵, Nishiuchi (2000)⁴⁸ y Vinogradov ,(2000).⁴⁹ Demostraron la existencia de reacción cruzada de *E. coli* O157:H7 con los serotipos O116 y O7, además de *Yersinia enterocolitica*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter sedlakii* y *Brucella abortus*. La ausencia de esta reacción cruzada con diferentes bacterias demuestra la especificidad del dispositivo de prueba, ya que tampoco se detectaron reacciones positivas con los serotipos O116 y O7 de *E. coli*, a pesar de que en un estudio previo se encontraron cruces antigénicos con estos serotipos (Navarro 2003).¹⁵ Los resultados obtenidos en el presente trabajo concuerdan con la especificidad establecida por el fabricante del dispositivo, ya que no se observó reacción cruzada con *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter cloacae*.

De acuerdo con Blanco (2000),¹⁸ existe reacción cruzada fuerte entre algunos antígenos O de *E. coli* y de *Shigella*. Virtualmente todos los antígenos de *Shigella*, excepto *S. sonnei*, reaccionan con algunos antígenos de *E. coli*, lo que confirma la semejanza cercana entre *E. coli* y *Shigella*. Otras reacciones importantes que se han encontrado son aquellas que se dan entre los antígenos de *E. coli* y de *Salmonella* (*E. coli* O111 y *Salmonella* O35). En este estudio se demostró que el dispositivo es capaz de discriminar entre estas cepas ya que

no se observó tal reacción cruzada con las salmonelas evaluadas (*Salmonella* spp. y *Salmonella typhi*); resultados semejantes se han reportado con otros dispositivos, como el que fabrica la compañía Interciencia SA, cuyo dispositivo para la detección de *Salmonella* reporta una especificidad y sensibilidad del 100%.

Aunque es este estudio no se encontró una reacción cruzada de *E. coli* O157 con *Vibrio cholerae*, Chart (1996)⁴⁵ habla de la reacción cruzada de O157 con *Vibrio cholerae* y *Salmonella*, ya que varios de los antígenos O de éstos son idénticos químicamente a los antígenos somáticos de *E. coli*.

El fabricante del dispositivo Reveal® indica que pueden existir reacciones cruzadas con *Salmonella urbana*, ya que comparten un LPS común con *E. coli* O157:H7 y *E. coli* O157 con otros antígenos flagelares como H 11, 12, 19, 38 y 45, además del O157:NM, la cual no es considerada por la mayoría de los autores como un serotipo del grupo EHEC (Nataro 1994).⁷ Estos reportes coinciden con el resultado obtenidos en el presente estudio, en el cual se observó una reacción positiva con la cepa O157:NM y anterior coincide también con lo mencionado por Blanco (1994),¹⁸ quienes han detectado numerosas reacciones cruzadas entre los antígenos O y K de diferentes cepas de *E. coli* y con los antígenos de otros géneros bacterianos .

Otras pruebas comerciales para diferentes agentes bacterianos y virales han mostrado alta eficacia, por ejemplo en el estudio de Bernard (2000).⁴⁶ Se encontró que al utilizar una prueba comercial para la detección de VIH, la sensibilidad de la prueba fue de 100% y la especificidad, de 99.9%. Sin embargo, algunas pruebas comerciales pueden reportar una baja eficacia. En el estudio de Berdayes (2000) ,⁴⁷ donde se prueba un dispositivo para la detección de *Candida* la especificidad fue del 90% y en otro dispositivo para la detección

de *Gardnerella* su especificidad fue del 86% lo cual deja un amplio margen para la aparición de falsos positivos.

En un estudio donde se compararon la SIM y prueba de PCR con las técnicas inmunológicas comercializadas por MERCK (Singlepath O157), FOSS (EIA O157) y BioMerieux (VIDAS O157), se determinó que los dispositivos comerciales, a pesar de tener una buena sensibilidad, producen numerosos resultados falsos positivos, ya que cuando se probaron estos sistemas en un grupo de becerros para detectar la presencia de *E. coli* O157:H7, se encontró en sus heces 7% de *E. coli* no patógena del serotipo O157:H29 que dan positivo en los ensayos inmunológicos basados en la detección del antígeno O157.

En otro estudio realizado en México en muestras de bovinos y cerdos se encontró 2.08% de prevalencia de *E. coli* O157 menor a la incidencia reportada en EU, sin embargo cuando se realizó la identificación serológica de las cepas presuntas positivas se comprobó que todas ellas pertenecían al serotipo O157 NM lo cual coincide con los resultados de este trabajo.⁵⁰ Por lo tanto es muy importante confirmar el resultado presuntivo obtenido en estas técnicas mediante el aislamiento bacteriano para la detección de O157:H7, y para realizar dicho aislamiento es imprescindible realizar la SIM y utilizar el medio agar MacConkey sorbitol con Telurito y cefixima (CT-SMAC). Por este motivo, se concluyó que el método idóneo para la detección de las cepas EHEC, es el uso de una combinación de la SIM y la PCR (Chapman).³⁵

CONCLUSIONES

El presente trabajo demostró la utilidad de medios alternos para la realización de la prueba de Reveal®, siendo el caldo infusión cerebro corazón, caldo triptosa y caldo triptosa fosfato, buenas opciones para la técnica.

El dispositivo de inmunocaptura Reveal® para la detección de *E. coli* O157:H7 no detectó reacción cruzada con enterobacterias tales como: *E. coli* O116:H10, *E. coli* O7:K1, *Enterobacter* spp., *Enterobacter cloacae*, *Salmonella* spp., *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Citrobacter* spp., *Citrobacter freundii*, *Yersinia* spp., *Vibrio cholerae*, *Salmonella thyphi* y *E. coli* O157:NM, demostrando su alta sensibilidad y especificidad.

Perspectiva:

Se sugiere realizar más trabajos al respecto comparando la inmunocaptura con la separación inmunomagnética, además de evaluar diferentes dispositivos de inmunocaptura para determinar la sensibilidad y especificidad de ellos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bell, Chris. *E. Coli*. Una aproximación práctica al microorganismo y su control en los alimentos. 2000. Acribia, Zaragoza, España. 6:27-29
2. Coles, E.H.: Diagnóstico y Patología en Veterinaria. 1989. Ed. Interamericana, México. 39:129-135
3. Sharp, J.C, Coia J.E. Curnow J. Reilly W. *Escherichia coli* O157 infection in Scotland. 1994. J. Med. Microbiol. 40:3-9
4. Advisory Committee on the Microbiological Safety of Food. Report on Verocytotoxin-Producing *Escherichia coli*, 1995. HMSO. 2-6
5. Heller, E. D. And Drabkin. Passive immunization of chicks against *Escherichia coli*. 1997. Avian Pathol 19:345-354.
6. Collins, C.H.: Métodos Microbiológicos. 1989. Ed. Acribia. España.
7. Nataro, James. Diarrheagic *Escherichia coli*. 1994. Microb. Rev. 11:142-201
8. Salyers, A.A. and Whitt, D.D. Bacterial pathogenesis-a molecular Approach. ASM press, 1994. Washington, DC. 190-204.
9. Elfadil and Meek. Impact of stocking density, breed, and feathering on the prevalence of abdominal skin scratches in broiler chickens. 1998. Avian Dis 40:546-552.
10. Rosario, C. C., C. C. López, I. G. Téllez, O. A. Navarro, R. C. Anderson, and C. C. Eslava. Serotyping and virulence genes detection in *Escherichia coli* isolated from fertile and infertile eggs, dead in shell embryos and chicken with yolk sac infection. Avian Dis. In press.

11. Beutin, L., Gleier, K. et al. Origin and characteristics of enteroinvasive strains of *Escherichia coli* isolated in Germany. 1997. *Epidem. and Infection*, 118-199.
12. Sussman, M. *Escherichia coli* and humasin disease, in *Escherichia coli: Mechanisms of virulence* (ed. M. Sussman). 1997. Cambridge University Press, Cambridge, 3-48.
13. Willshaw, G.A., Scotland, S.M. and Rowe G. Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli*, in *Escherichia coli: Mechanism of Virulence*. 1997. Cambridge University Press, Cambridge, 421-448.
14. Revista Ciencia Hoy. Brote de *Escherichia coli* O157:H7 1999. España. 53:1221.
15. Navarro A. Antibody Responses to *Escherichia coli* O157 and other Lipopolysaccharides in Healthy Children and Adults. *Clinical and Diagnostic Lab. Immunology*. 10:797-801.
16. Sussman, D. Jones and M.F. Stringer, The Society for Applied Bacteriology Symposium Series J. of Appl. Bacteriology Symposium 1987. Supplement. Blackwell Scientific Publications, London, 17:71-77.
17. Michanie Silvia, Ganados y Carnes. Revista de la unión de la industria cárnica. Argentina. 2003 17:40-42.
18. Blanco Miguel. ECVT O157:H7 Y NO-O157 en humanos y en alimentos. Laboratorio de Referencia de *Escherichia coli* (LREC). 2002. Santiago de Compostela.
19. Tilden, McNamara, A.M, Custer C, A new route of transmission for *Escherichia coli*: infection from dry fermented salami. 1996. *American J. of Pub. Health*, 86: 1142- 1145.

20. C. S. Stewart and H J. Flint. *Escherichia coli* O157 in farm animals. 1999.USA
21. Heller, E. D. and Drabkin L. Passive immunization of chicks against *Escherichia coli*. 1997. Avian Pathol 19:345-354.
22. Pilipcinec, E., L. Isolation of verotoxigenic *Escherichia coli* O157 from Poultry. 1997. Folia Microbiol 44:455-456.
23. Schmidt H. and Karch H. A new Shiga toxin 2 variant from *Escherichia coli* isolated from pigeons. 2000. Appl Environ Microbiol 66:1205-1208.
24. Anon J. Common gastrointestinal tract infections. 1997. Laboratory reports, weeks 01-52, Inglaterra. Communicable Disease Report, 8:2-14.
25. Wallace, Cheasty K. Isolation of Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 from wild birds. 1998. J. of Applied Microbiology, 82:339-404.
26. Anon J. Common gastrointestinal tract infections, Laboratory reports, weeks 01-06, 1998, Inglaterra. Communicable Disease Report, 8:59
27. Steele BT. An outbreak of hemolytic uremic syndrome associated with ingestion of fresh apple juice. 1982. J. of Pediatrics, 101, 963-965.
28. Chapman, P.A., Wright D.J. Immunomagnetic separation as a sensitive method for isolating *E. coli* O157 from food samples. 1994 Epidemiol Infected. 113:31
29. Johnson J.R. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. 1991. Clinical Microbiology 34:116-121
30. Padhye, N.V. & Doyle, Rapid procedure for detecting enterohemorrhagic *E. coli* O157 in food. 1991 Appl. Environ. Microbiol. 57:2693-2698.
31. Suthienkul O. Brown J.E, Echeverria P. Shiga like toxin producing *E. coli* in retail meats and cattle in Thailand. 1990 Appl. Environ. Microbiol. 56:1135-1139.

32. Willshaw, G.A. Examination of raw beef products for the presence of Verocytotoxin producing *Escherichia coli*, particularly those of serogroup O157 1993 J. Appl. Bacteriol. 75:420-426.
33. Clarke, R.C, Mc Ewen S.A., Gannon B.P. Isolation of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* from milk filters in south-western Ontario. 1989 Epidemiol. Infect. 102:253-260
34. Wright, D.J. and Chapman P.A. 1994 Immunomagnetic separation as a sensitive method for isolating *Escherichia coli* O157 from food samples Epidemiol. Infect. 113:31-39.
35. Chapman, P.A. Siddons C.A, Manning J., Cheetham C. 1997. An outbreak of infection due to verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in four families: the influence of laboratory methods on the outcome of the investigation. Appl. Environ. Microbiol. 63:2549-2553.
36. Chapman, P.A. Siddons C.A , Gerdan Malo, Harkin M.A. 1997 A 1-year study of *Escherichia coli* O157 in cattle, sheep, pigs and poultry. Epidemiol. Infect. 119:245-250.
37. Betts, R.P. The Catalogue of rapid Microbiological Methods, 1998 Review No. 1, 3rd edn. 13-14.
38. Besser and Weber, J.-T. An outbreak of diarrhea and hemolytic uremic syndrome from *Escherichia coli* O157:H7 in fresh-pressed apple cider. 1993. J. of the American Medical Association, 269:2217-2220.
39. Ahmed, N, D.E. Connor, and D.L. Huffman, 1995. Heat-resistance of *Escherichia coli* O157: H7 in meat and poultry as affected by product composition. J. Food Sci. 60:606-610.

40. Bennett, A.R., Macphee, Sand Betts, R.P. 1995. Evaluation of methods for the isolation and detection of *Escherichia coli* O157 in minced beef. Letters in Applied Microbiology 20: 375-379.
41. Weadant Stephen D., Bryant James & Jineman Karen G. 1995. An Improved Rapid Technique for Isolation of *Escherichia coli* O157 : H7 from Foods. J. of Food Protection 58:12
42. Lina Franco. Determinación de *E. coli* O157 a partir de productos cárnicos y lácteos artesanales empleando dos sistemas de aislamiento. 1992.Laboratorio de Microbiología Veterinaria, Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Carrera 7. SantaFé de Bogotá D.C. Colombia. 43:82
43. Instituto Nacional de Alimentos 2003. Chile www.ispch.cl/portada.html
44. Biotechnology Methos for detection of GMO grain in comerse 2002. <http://www.envirologix.com/artman/publish/>
45. H. Chart, Cheasty T., Smith H.R. Vero Citotoxinin-producing *Escherichia coli*, particularly serogroup O 157, associated with human infections in the United Kingdom Disease and Prevention, July 1993 5:81-84
46. Bernard Lo and Burkes A.W. Serological characteristics of allergy in children 2003. Center of AIDS Prevention Studies. Allergy Dec 58:1285-1288
47. Berdayes Hilda. 2000. El Habanero Cuba, La Habana. <http://www.elhabanero.cubaweb.cu/sumarios/>
48. Nishiuchi Yukiko. Structure and serologic properties of O-specific polysaccharide from *Citrobacter freundii* possessing cross-reactivity with *Escherichia coli* O157:H7.2000 Immunology and Medical Microbiology 28:163-171