



Universidad de Barcelona
Departamento de Microbiología
Facultad de Biología

Bacteriófagos portadores del gen de la Stx 2 en aguas

Vº Bº del Director de la tesis

Dr. Joan Jofre Torroella

Memoria presentada por
M^a Teresa Muniesa Pérez
para optar al grado de
Doctor en Biología

Barcelona, Julio de 1998

Programa de doctorado: Microbiología Ambiental y Biotecnología
Bienio: 94-96

*Capítulo 2:
Distribución y diversidad de los
bacteriófagos portadores del gen de la Stx 2*

Capítulo 2

Distribución y diversidad de los bacteriófagos portadores del gen de la Stx 2

2.1.- Introducción

Los estudios descritos en el capítulo anterior indicaron la abundancia de fagos portadores del gen de la Stx 2 en muestras de agua residual correspondientes al área urbana de Barcelona.

Se consideró interesante determinar si este hecho era comparable a lo que ocurría en otras partes del mundo. No hay información sobre la ubicuidad de los bacteriófagos portadores del gen de la Stx 2, pero sí que existe numerosa bibliografía sobre la epidemiología provocada por cepas bacterianas portadoras de la Stx 2, especialmente por *E. coli* O157:H7.

2.1.1.- Distribución geográfica de infecciones producidas por *E. coli* O157:H7

Se han descrito numerosas epidemias debidas a cepas EHEC en diferentes partes del mundo

Las infecciones causadas por *E. coli* enteropatógenicas son mucho más frecuentes en países en fase de desarrollo que en países industrializados. En los países en fase de desarrollo (África y el sudeste asiático entre las zonas más afectadas), las cepas EHEC son causantes de numerosos brotes (Isaacson y col. 1993, Echeverría y col. 1985; Albert y col., 1992).

No obstante, algunos serotipos EHEC y en concreto *E. coli* O157:H7, se distinguen porque además se han detectado como causantes de numerosos brotes

epidémicos en países industrializados. Por esta razón, desde que se identificó el serotipo O157:H7 de *E. coli* (Riley y col., 1983), existe abundante bibliografía que describe los brotes producidos por *E. coli* O157:H7 en estos países.

Una gran parte de la información se centra en epidemias producidas por *E. coli* O157:H7 en el continente americano. Parece que, si bien las infecciones esporádicas de O157:H7 son más frecuentes en Canadá, es en EE.UU. donde han tenido lugar las epidemias más importantes (Mac Donald y Osterholm, 1993; Griffin, 1995). En EE.UU, *E. coli* O157:H7 es considerada la cuarta causa de infecciones por ingestión de alimentos (Center for Food Safety and Applied Nutrition, 1992). Todo esto ha llevado a tomar medidas preventivas para evitar al máximo las infecciones producidas por *E. coli* O157:H7 . (Center for Disease Control and Prevention, 1997).

Datos epidemiológicos de Canadá y EE.UU. (CDC, Center for Disease Control), describen tres epidemias que tuvieron lugar en 1982, dos en Michigan y Oregón por contaminación de alimentos en una cadena de restaurantes y una en Ontario, debida también a una empresa de alimentación. Posteriormente se describieron dos grandes epidemias en 1984, una en 1985 y tres en el 1986 en el noroeste de EE.UU. y en Canadá. En 1990 se produjeron de nuevo infecciones de O157:H7 en Dakota del norte. En 1992 en Missouri se describió otra epidemia debido a ingestión de agua contaminada procedente de la red municipal.

A finales del 1992 y principios del 1993 se describió la mayor epidemia producida en EE.UU. por O157:H7, el vehículo de transmisión fueron las hamburguesas procedentes de una cadena de restaurantes de comida rápida, se reportaron casos en toda la zona oeste de EE.UU. y simultáneamente tuvieron lugar otros 16 brotes en el resto de país.

Durante los primeros meses de 1994, se describieron 11 brotes causados por *E. coli* O157:H7, algunos de ellos por contacto con aguas recreacionales. En 1995 se

describieron nuevas epidemias causadas por O157:H7, una en una estación de vacaciones de Nueva Jersey, otra en Washington y una tercera en California, las dos últimas asociadas a la ingestión de embutido. En 1997 se describieron en Virginia y Michigan dos epidemias causadas por O157:H7 asociada a la ingestión de brotes de alfalfa contaminados.

Además de en EE.UU. y Canadá, existen también numerosas descripciones de epidemias causadas por O157:H7 en otros países. Desde 1985 se han descrito numerosas epidemias causadas por O157:H7 en el Reino Unido (Morgan y col., 1988). Entre 1989 y 1992 se produjeron 17 brotes de colitis hemorrágica en Escocia. En 1996 se detectó, también en Escocia, otro brote muy grave (Nataro y Kaper, 1998).

El mismo año tuvo lugar una gran epidemia que afectó a escolares en la región de Osaka, en Japón, causada por O157:H7. La infección se produjo supuestamente por la ingestión de brotes de soja contaminados (Swinbanks, 1996). Produjo más de 10.000 casos de los cuales al menos 1000 tuvieron que ser hospitalizados y se registraron 12 fallecimientos.

En nuestro país se han descrito tres brotes causados por O157:H7, en Ibiza en 1985 y 86, en Mallorca en 1994 y en Fuerteventura en 1997. Curiosamente los brotes afectaron únicamente a turistas extranjeros. En el último brote, en Fuerteventura, la característica común de los casos detectados fue que todos tuvieron lugar en centros hoteleros que se abastecían de agua de un mismo pozo, que no estaba controlado sanitariamente, por lo que se cree que el brote tuvo un origen hídrico (Blanco, 1997).

2.1.2.- Distribución de serotipos no-O157:H7 portadores del gen de la Stx 2

La mayoría de infecciones causadas por cepas EHEC están producidas por el serotipo O157:H7. Esto sugiere que este serotipo es, de algún modo, más virulento o que se transmite con mayor eficacia que otros serotipos (Nataro y Kaper, 1998). No

obstante, serotipos de *E. coli* diferentes a O157:H7 también pueden ser causantes de brotes esporádicos.

Existen aproximadamente 200 serotipos de *E. coli* que pueden expresar Stx, entre estos, más de 50 serotipos se han asociado con el síndrome urémico hemolítico o con colitis hemorrágica en seres humanos.

Los serotipos no-O157:H7 más comúnmente asociados con enfermedades en humanos son O26:H11, O103:H2, O111:NM y O113:H21. Se han descrito al menos diez epidemias, causadas por esos organismos, en países como Japón, Alemania, Italia, Australia, la República Checa y los EE.UU.

Por ejemplo en el sur de Australia, donde los serotipos O111:H- y O48:H21 (productoras ambas de Stx 2) causaron en 1994 una grave epidemia de síndrome urémico hemolítico (Goldwater y col., 1995).

Algunos estudios realizados en Australia, Chile y Argentina describen que la mayoría de casos de síndrome urémico hemolítico que tienen lugar en estos países están causados por serotipos no-O157:H7.

Algunas cepas de *E. coli* productoras de Stx aisladas de pacientes en Bélgica o EE.UU. (Seattle, Boston o Virginia), demuestran que un alto porcentaje de estas cepas corresponden a serotipos no-O157:H7 (Nataro y Kaper. 1998).

2.1.3.- Variantes de la Stx 2

La Stx 2 es la primera toxina descrita de una familia de citotoxinas. Esta familia de citotoxinas comprende a la Stx 2 y a toda una serie de variantes de Stx 2 aisladas de varios serotipos de *E. coli*, incluido el serotipo O157:H7, así como de otras enterobacterias.

2.1.3.1.- Características generales

En general todas las toxinas de la familia Stx 2, comparten las mismas características ya descritas en el capítulo 1 de esta tesis. Todas presentan la misma estructura de una subunidad catalítica A y cinco subunidades B conformando la toxina madura (MacLeod y col., 1991, Ohmura y col., 1993).

Todas las toxinas de la familia Stx 2 muestran características genéticas comunes. Presentan una elevada homología en la secuencia de ADN y una gran similitud en la estructura del operón que codifica para ellas, con el gen que codifica para la subunidad A seguido del gen que codifica para la subunidad B.

A pesar de sus características comunes, presentan ligeras diferencias entre ellas. Sus genes, especialmente los que codifican para la subunidad A, si bien muy similares no son idénticos. Los que codifican para la subunidad B por el contrario presentan mayor homología.

Asimismo se observan diferencias entre los pesos moleculares de sus subunidades, especialmente en la subunidad A, que se muestra más heterogénea que las subunidades B (Rüssmann y col., 1994).

También se las distingue por su antigenicidad, ya que los anticuerpos monoclonales contra la subunidad A de la Stx 2 no neutralizan completamente a todas sus variantes (Lindregg y col., 1994), aunque sí a muchas de ellas.

Las variantes presentan también diferencias en lo que se refiere a su citotoxicidad y a su actividad biológica sobre modelos animales (Takeda y col., 1993).

2.1.3.2.- Tipos de variantes de la Stx 2

Es complicado establecer cuantas variantes existen de la toxina Stx 2. A lo largo de los años se han descrito nuevas variantes pertenecientes a la familia de toxinas Stx 2. La aparición de nuevas variantes y los cambios en la nomenclatura hacen que la información disponible sea confusa.

A continuación se intenta establecer una relación de las variantes de la Stx 2 aisladas de *E. coli*, descritas hasta el momento, ordenándolas por cronología de publicación.

La Stx 2v fue la primera variante descrita diferente de la Stx 2 (Wenstein y col., 1988). Es producida por una cepa de *E. coli* del serotipo O139, aislada del tracto intestinal de ganado porcino. Las cepas productoras de esta variante de la Stx 2 son responsables de la enfermedad edematosa en el ganado porcino. Posteriormente esta variante fue clasificada como Stx 2e o VT2vp1 (Johnson y col., 1990, O'Brien y col., 1994).

La VT2vha (o VT2v-a), producida por una cepa del serotipo de *E. coli* O91:H21 aislado de pacientes humanos (Oku y col., 1989). Este serotipo fue estudiado posteriormente por Ito y col., (1990) observándose que esta cepa poseía, en realidad, dos operones diferentes que codificaban para dos variantes de la Stx 2, las llamaron VTx2ha y VTx2hb.

La Stx 2a (VT2vp2) producida por una cepa del serotipo O128:B12 de origen humano (Gannon y col., 1990).

La Stx 2c. (Schmitt y col., 1991), producida por *E. coli* O157:H-, cepa E32511, de origen humano. Esta misma cepa de *E. coli* posee además los genes que codifican para Stx 2, con lo que apareció un nuevo caso de una cepa bacteriana que posee dos

operones que codifican para dos toxinas de la misma familia. Este hecho indica que, o bien existen fagos muy diferentes que transportan el gen de la toxina y que pueden infectar a la misma cepa, o que hay casos en que el gen de la toxina no va ligado al genoma de bacteriófagos.

La Stx 2hc, que fue descrita por Meyer y col., (1992) obtenida de la cepa 7279 de *E. coli* O157:H7, también de origen humano.

Otra Stx 2v producida por una *E. coli* de origen humano, serotipo O111:H- (Paton, Paton y Manning., 1993) y dos nuevas variantes (Stx 2v) aisladas por el mismo laboratorio producidas por el serotipo OX3:H21 (Paton, Paton, Heuzenroeder y col., 1993), también de origen humano.

Cuatro nuevas secuencias correspondientes a la variante Stx 2e fueron descritas por Franke y col. (1995), todas ellas producidas por diferentes cepas de *E. coli* del serotipo O101 aisladas del tracto intestinal de cerdos. Estas variantes Stx 2e son muy similares, aunque no, iguales a la secuencia de la Stx 2e del serotipo O139, igualmente de origen porcino.

Más recientemente se ha descrito una nueva Stx 2e, producida en este caso por una cepa de *E. coli* R 107 aislada de conejos (Kim y col., 1997).

Como se ha indicado anteriormente, otras especies bacterianas también producen variantes de la Stx 2. Entre estas se encuentran la Stx 2v producida por *Citrobacter freundii* (Schmidt y col. 1993) y la Stx 2v producida por *Enterobacter cloacae* (Paton y col., 1996).

Los cebadores utilizados para la realización de la primera PCR y de la PCR anidada en los estudios que se presentan, están situados en zonas altamente conservadas del gen de la Stx 2 y presentan elevada homología con las secuencias de los genes de las distintas variantes de la toxina.

2.1.3.3.- Fagos portadores de los genes de las variantes de la Stx 2

Se desconoce por el momento si los genes que codifican para las variantes de la Stx 2 están englobados en el genoma de bacteriófagos, de igual modo que ocurre con la toxina Stx 2 (Takeda y col., 1993).

2.1.4.- Fagos portadores del gen de la Stx 2 en agua residual

No existe ninguna información disponible sobre la distribución de los fagos portadores del gen de la Stx 2 en muestras de agua.

2.1.5.- Objetivos

Determinar si, al igual que sucede para *E. coli* O157:H7, los fagos portadores del gen de la Stx 2 que la infectan, muestran una amplia distribución geográfica.

Verificar si el gen transportado por estos fagos corresponde únicamente al gen de la toxina Stx 2 o si existe la posibilidad de que transporten los genes de alguna de sus numerosas variantes.

Capítulo 2

2.2.- Materiales y Métodos

2.2.1. Muestras utilizadas

Las muestras utilizadas para estos experimentos provenían de zonas geográficamente alejadas del área urbana de Barcelona y suficientemente diversas. La elección de las muestras se hizo en base a la posibilidad de obtenerlas. Todas ellas fueron muestras de agua residual tomadas a la entrada de depuradoras urbanas o provenientes de granjas y mataderos.

Algunas de las muestras fueron congeladas inmediatamente después de la recolección utilizando como crioprotector glicerol al 10 % (v/v). Otras, simplemente se conservaron y transportaron a 4 °C. El tiempo transcurrido entre la recogida de las muestras y la llegada a nuestro laboratorio osciló entre 4 y 12 días dependiendo de la muestra. Aunque se hizo un esfuerzo por mantener las condiciones de transporte, algunas de las muestras llegaron en condiciones subóptimas (*).

Una vez llegadas a nuestro laboratorio, las muestras fueron congeladas utilizando glicerol al 10 % (v/v) como crioprotector hasta el momento de realizar los análisis.

(*) NOTA: Estas condiciones conducen necesariamente a tener que infravalorar los resultados obtenidos. Debido a esta estimación a la baja, si bien se pueden asegurar los resultados positivos obtenidos, no se pueden afirmar los resultados negativos. Por lo tanto en ningún caso se pretende comparar los niveles de muestras positivas y negativas ni calcular los porcentajes de muestras positivas respecto al total de muestras estudiadas.

2.2.1.1.- Zona de origen

Europa norte

Suecia

Europa centro

Alemania

Austria

Francia

Holanda

Irlanda

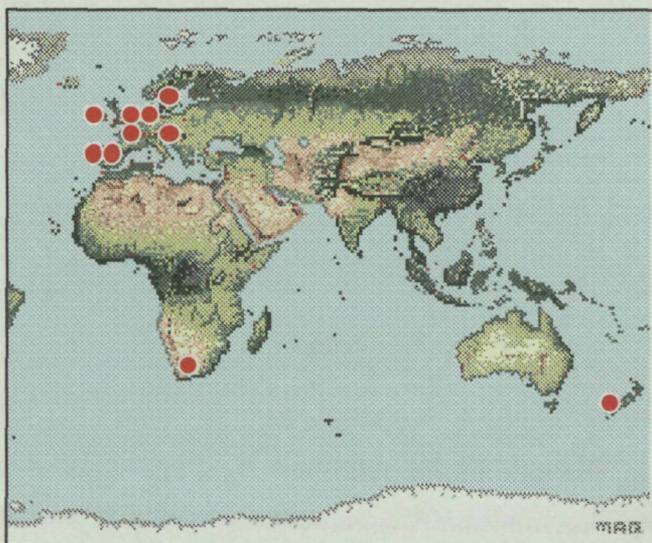
Europa sur

España

Portugal

Sudáfrica

Nueva Zelanda



En la Tabla 2.1 se indican los códigos utilizados para cada muestra, el país y los lugares de origen.

Las características de las muestras se expresan para cada una según el origen principal de la contaminación, sea humana o animal, y, en caso de ser humana, el número de habitantes del que proviene dicha contaminación.

Tabla 2.1.- Características de las muestras analizadas, agrupadas por países.

<u>Suecia</u>			
Código	Población	Tipo de contaminación	Número de habitantes
U1	Umea	Humana	100.000
U2	Umea	Humana	100.000
U3	Umea	Humana	100.000
U4	Umea	Humana	100.000

<u>Alemania</u>			
Código	Población	Tipo de contaminación	Número de habitantes
A1	Tübingen	Humana	200.000
A2	Tübingen	Humana	150.000

<u>Austria</u>			
Código	Población	Tipo de contaminación	Número de habitantes
O1	Lockenhaus	Humana	13.000
O2	Waidhofen	Humana	15.000

Francia

Código	Población	Tipo de contaminación	Número de habitantes
F1	Armentières	Humana	50.000
F2	Caudry	Humana	11.000
F3	Jeumont	Humana	37.000
F4	Formies	Humana	15.000
F5	Marchiennes	Humana	3.500
F6	Samaritaine	Humana	40.000
F7	Steenvorde	Humana	30.000
F8	Flesquieres	Humana	400
F9	Cappellebrouk	Humana	1000
F10	Bergues	Humana	17.500

Holanda

Código	Población	Tipo de contaminación	Número de habitantes
H1	De Bilt	Humana	70.000
H2	Amsterdam	Humana	400.000

Irlanda

Código	Población	Tipo de contaminación	Número de habitantes
I1	Swords ^(a)	Humana	650.000
I2	Ringsend	Humana	20.000

(a)Correspondiente a una zona industrial

España

Código	Población	Tipo de contaminación	Número de habitantes
E1	San Sebastián	Humana	50.000
E2	P. Mallorca	Animal	-
E3	P. Mallorca	Animal	-

Portugal

Código	Población	Tipo de contaminación	Número de habitantes
P1	Oporto	Humana	21.300
P2	Oporto	Humana	62.100
P3	Oporto	Humana	11.200

Sudáfrica

Código	Población	Tipo de contaminación	Número de habitantes
SA1	Zeekoeigat	Humana	ND ^(a)
SA2	Rooiwal	Humana	ND
SA3	East Intake ^(b)	Humana	ND
SA4	West Intake ^(c)	Humana	ND
SA5	Granja vacuno	Animal	-
SA6	Granja porcina	Animal	-

(a) Datos no disponibles

(b) Depuradora Daspoort. Afluente.

(c) Depuradora Daspoort. Efluente primario.

Nueva Zelanda

Código	Población	Tipo de contaminación	Número de habitantes
NZ1	Christchurch	Humana	ND ^(a)
NZ2	Hamilton	Humana	ND
NZ3	Hamilton	Humana	ND

(a) Datos no disponibles

2.2.2.- Cepas bacterianas y medios de cultivo

Las cepas huésped utilizadas fueron *E. coli* CN13 para la enumeración de colifagos somáticos y *E. coli* O157:H7 ATCC 43888 para la enumeración de fagos infecciosos para esta cepa. El medio utilizado fue el de Scholten's modificado (Anexo 1). La metodología utilizada se describe en el apartado de Materiales y Métodos Generales.

Asimismo, se utilizó la cepa *E. coli* O157:H7 ATCC 43888 como cepa huésped en los cultivos de enriquecimiento dirigidos al estudio de los fagos infecciosos para O157:H7 portadores del gen de la Stx 2. Estos cultivos de enriquecimiento se realizaron con el medio Scholten's modificado.

2.2.3.- Purificación parcial de los bacteriófagos, enriquecimiento, extracción del ADN y amplificación por PCR

El protocolo seguido fue idéntico al descrito en el capítulo 1, se repite aquí brevemente.

Se sometió a las muestras a un tratamiento previo antes de realizar los enriquecimientos, para eliminar cualquier otro elemento diferente de los bacteriófagos presente en el agua residual. Los bacteriófagos fueron parcialmente purificados del agua residual mediante filtración con membranas de 0,22 μm (Millex™-GV Millipore) y tratamiento con ADNasa.

Se infectó 100 ml de un cultivo de *E. coli* O157:H7 ATCC 43888 con los bacteriófagos parcialmente purificados a partir de volúmenes decrecientes de agua residual (10, 1, 0,1 y 0,01 ml). El volumen final de cada cultivo de enriquecimiento fue

ajustado a 250 ml con medio Scholten's modificado. Los cultivos de enriquecimiento se incubaron a 37°C durante 18 horas.

Los sobrenadantes de dichos cultivos se centrifugaron a 12.000xg durante 30 minutos. Se purificaron los fagos presentes en dichos sobrenadantes mediante filtración y tratamiento con ADNasa. Se extrajo el ADN de los bacteriófagos y a partir de éste se amplificó el gen de la Stx 2 mediante PCR anidada

2.2.4.- Comparación de los fragmentos del gen de Stx 2 obtenidos por PCR anidada

Se secuenciaron los amplímeros obtenidos a partir de las muestras analizadas por PCR anidada que presentaron resultados positivos para el gen de la Stx 2. Las secuencias obtenidas se compararon con la secuencia del gen de la Stx 2.

2.2.4.1.- Muestras utilizadas

Se analizaron las muestras descritas en el apartado anterior.

Además se incluyeron en este estudio cinco series de cultivos de enriquecimiento realizados con muestras de agua residual provenientes de la entrada de una depuradora de origen fisicoquímico del área urbana de Barcelona cuyos resultados se presentan en el capítulo 1 de esta memoria de tesis.

2.2.4.2.- Secuenciación

De cada serie de cultivos de enriquecimiento, se escogió para secuenciar el amplímero correspondiente al sobrenadante del cultivo de enriquecimiento infectado

con bacteriófagos purificados del menor volumen de agua residual que presentó resultado positivo. Por ejemplo, en una determinada serie de cultivos de enriquecimiento, se detectaron fagos portadores del gen de la Stx 2 en el sobrenadante de los cultivos infectados con fagos purificados de 10, 1 y 0,1 ml de una misma muestra de agua residual. En este caso, se escogió para secuenciar el amplímero correspondiente al cultivo de enriquecimiento que fue infectado con fagos purificados a partir de 0,1 ml de agua residual.

Los cebadores utilizados para la secuenciación fueron los mismos que para la PCR anidada. Están situados entre las posiciones 551 y 720 de la secuencia genética del gen de la Stx 2 del fago 933 W, como se indica en el apartado de Materiales y Métodos del capítulo 1

Se realizó una secuenciación automática con el cebador directo y reverso. La comprobación de las secuencias se realizó mediante la secuenciación directa y reversa del mismo ADN a fin de verificar los resultados comparando las secuencias de ambas cadenas. Se aceptaron como válidas las secuencias coincidentes después de cotejar las dos cadenas. En caso de existir alguna diferencia, se repitió el proceso de secuenciación. Si después de esto, aún persistía alguna diferencia entre ambas cadenas, (en ocasiones como consecuencia de la aparición de nucleótidos indeterminados), se aceptó como correcta aquella cadena que presentó mayor similitud con el gen de la Stx 2 (código EMBL X07865).

En algunos casos, la secuenciación del amplímero mediante los cebadores directo y reverso no abarcó la longitud total del amplímero, por lo que en los extremos de las cadenas no pudieron compararse las secuencias de la cadena directa con su reversa. En estos casos, se aceptaron como válidas la zonas de los extremos que, si bien no se podían verificar mediante comparación de las cadenas directa y reversa, presentaron total homología con la secuencia del gen de la Stx 2.

Aquellos extremos de las cadenas secuenciadas no coincidentes con la secuencia del gen de la Stx 2, se eliminaron de la secuencia estudiada y no se tuvieron en cuenta para realizar el análisis comparativo. Ésta es la razón de que la longitud indicada para los fragmentos secuenciados fuera menor a la totalidad del amplímero obtenido por PCR anidada (169 pb) y que dicha longitud fuera variable dependiendo de la muestra, como se puede observar en el apartado de resultados de este capítulo.

Como consecuencia de este proceso de tratamiento de las secuencias obtenidas, se obtuvo una secuencia *consensus* para cada uno de los amplímeros secuenciados. Esta secuencia fue utilizada para la comparación con la secuencia del gen de al Stx 2.

Otra vez se quiere recordar que no se intentó realizar un estudio exhaustivo de las secuencias (éste es un tema que sobrepasa los objetivos de esta tesis), sino que se pretendió verificar si la metodología aplicada permitía detectar en bacteriófagos la diversidad descrita para la Stx 2.

2.2.5.- Comparación de los amplímeros obtenidos con secuencias previamente descritas

2.2.5.1.- Comparación con secuencias del gen de la Stx 2

Estudios previos realizados durante el diseño de los cebadores y la sonda (Materiales y Métodos capítulo 1), demostraron que todas las secuencias descritas en los bancos genéticos para el gen de la Stx 2 coincidían con un 100 % de homología en el fragmento comprendido entre los dos cebadores utilizados para la PCR anidada. Por ello se utilizó una de ellas como modelo del gen de la Stx 2, la correspondiente al fago 933 W (código EMBL X07865). Como ya se indicó en el apartado 1.2.6.1 del capítulo anterior, se decidió utilizar como modelo la secuencia correspondiente al gen de la Stx

2 inserto en el bacteriófago 933 W, por tener mayor relación con los estudios que se realizaban.

Se compararon las secuencias obtenidas con la del gen Stx 2 y se estudió se existían diferencias.

Para comparar las secuencias, se utilizó el programa FastA del "Genetics Computer Group Package" (Devereux y col., 1984). Se realizó un alineamiento múltiple mediante el programa informático Pile Up basado en el método de Needleman y Wunsch (1970).

Después de analizar las diferencias existentes entre las secuencias estudiadas y el gen de la Stx 2, se calculó el porcentaje de homología de las secuencias estudiadas con la secuencia del gen de la Stx 2 en el fragmento secuenciado.

2.2.5.2.- Comparación con variantes de la toxina Stx 2

Una vez realizado el estudio de homología de las secuencias obtenidas con el gen de la Stx 2, y después de observar que algunas secuencias presentaron diferencias respecto a éste (ver apartado de resultados), se pretendió estudiar si algunas de estas secuencias coincidían con los genes de alguna de las numerosas variantes de la toxina Stx 2.

Para ello se realizó un estudio comparativo de aquellas secuencias que presentaron alguna diferencia con el gen de la Stx 2, con los genes de algunas variantes de la Stx 2 depositadas en los bancos genéticos de la EMBL y GenBank (Tabla 2.2).

Tabla 2.2- Relación de variantes de la Stx 2 descritas hasta la actualidad y cuyas secuencias están depositadas en los bancos genéticos de la EMBL y el GenBank

Tipo de variante	Cepa de origen	Código EMBL	Referencia	Código utilizado
Stx 2v	<i>E. coli</i> O111:H-	L11078	Paton y col., 1993 (II)	V1
Stx 2v	<i>E. coli</i> OX3:H21	L11079	Paton y col., 1993 (II)	V2
Stx 2v	<i>E. coli</i> OX3:H21	X65949	Paton y col., 1993 (I)	V3
Stx 2v ^(a)	<i>E. coli</i> O139	M21534	Weinstein y col. 1988	V4
Stx 2a	<i>E. coli</i> O128:B12	M29153	Gannon y col., 1990	Va
Stx 2c	<i>E. coli</i> O157:H-	M59432	Schmitt y col., 1991	Vc1
Stx 2vhc	<i>E. coli</i> O157:H7	X61283	Meyer y col., 1992	Vc2
Stx 2c	<i>Citrobacter freundii</i>	X67514	Schmidt y col., 1993	Vcf
Stx 2e	<i>E. coli</i> O101:H14 cepa E-D 42	X81418	Franke y col. 1995	Ve1
Stx 2e	<i>E. coli</i> O101: H- cepa E-D 43	X81417	Franke y col. 1995	Ve2
Stx 2e	<i>E. coli</i> O101: H- cepa E-D 53	X81416	Franke y col. 1995	Ve3
Stx 2e	<i>E. coli</i> O101:H- cepa E-D 68	X81415	Franke y col. 1995	Ve4
Stx 2e	<i>E. coli</i> R107	U72191	Kim y col., 1997	Ve5
Stx 2	<i>Enterobacter cloacae</i>	Z50754	Paton y col., 1996	Enc

(a) La secuencia de esta variante se halla descrita en el banco genético de la EMBL como una variante de la Stx 2. Tal como se ha indicado en la introducción de este capítulo, esta variante fue posteriormente identificada como Stx 2e (Johnson y col., 1990).

Antes de realizar la comparación de las secuencias *consensus* determinadas para los amplímeros obtenidos (según se describe en el apartado 2.2.4.2) con los genes de las variantes, se pretendió determinar las diferencias existentes entre los genes de estas variantes y el gen de la Stx 2 inserto en el genoma del fago 933 W. Para ello primero se realizó una comparación de las secuencias de las variantes con la propia secuencia de la toxina Stx 2 del bacteriófago 933W, calculándose el porcentaje de homología que presentaban las variantes con la secuencia de la Stx 2 en el fragmento estudiado.

Posteriormente se realizó una comparación de las secuencias estudiadas que presentaban diferencias con el gen de la Stx 2, con las secuencias de todas las variantes indicadas anteriormente (Tabla 2.2).

Para realizar esta comparación se utilizó de nuevo el programa FastA del "Genetics Computer Group Package" (Devereux y col., 1984) y se realizó un alineamiento múltiple mediante el programa informático Pile Up basado en el método de Needleman y Wunsch (1970).

Finalmente se calcularon los porcentajes de homología de las secuencias estudiadas con las secuencias de los genes de las variantes de la Stx 2 en el fragmento estudiado.

Capítulo 2

2.3.- Resultados

2.3.1.- Determinación de los fagos portadores del gen de la Stx 2 en aguas residuales de diversas procedencias

Todas las muestras se titularon para *E. coli* O157:H7 y la mayoría para los colifagos somáticos con *E. coli* CN13. Se observó que los niveles de contaminación de las muestras fueron variables (Tabla 2.1). Como ya se ha comentado en la sección de Materiales y Métodos de este capítulo, los resultados obtenidos representan una estimación a la baja de los niveles de todos los parámetros estudiados, debido a los problemas de transporte.

Se detectaron fagos portadores del gen de la Stx 2 en 15 de las 37 muestras de agua residual de diferentes orígenes analizadas. Se detectaron fagos portadores del gen de la Stx 2 en los sobrenadantes de cultivos de enriquecimiento infectados con fagos purificados de diferentes volúmenes de agua residual. El volumen mínimo de muestra utilizada para infectar los cultivos de enriquecimiento, donde se detectaron resultados positivos, varió según las muestras (Tabla 2.1).

Si se descartan 6 de las muestras entre el total de muestras analizadas, por presentar niveles de colifagos somáticos y de fagos que infectan a O157:H7 extremadamente bajos (lo que hace presuponer inactivación durante el transporte), entonces se puede determinar que en el 48 % de las muestras analizadas se detectaron fagos portadores del gen de la Stx 2.

Como ya se indicó en el apartado de Materiales y Métodos, la potencial infravaloración de los valores obtenidos, debido al proceso de transporte de las

muestras, no permite considerar este porcentaje más que como una aproximación y no se puede comparar con los resultados obtenidos de las muestras del área de Barcelona.

Tabla 2.1.- Resultados de los recuentos de colifagos somáticos y de fagos infecciosos para *E. coli* O157:H7 y resultados de la presencia/ausencia de fagos portadores del gen de la Stx 2 en aguas residuales de diferentes procedencias.

Muestras provenientes de Suecia						
Muestra	Colifagos somáticos ^(a) (ufp/ml)	<i>E. coli</i> O157:H7 (ufp/ml)	Presencia/ausencia de fagos portadores de Stx 2 ^(b)			
			Volumen de enriquecimiento			
			<i>10</i>	<i>1</i>	<i>0.1</i>	<i>0.01</i>
U1	1,3.10 ²	1,1.10 ⁰	-	-	-	-
U2	1,7.10 ²	2,5.10 ¹	-	-	-	-
U3	1,4.10 ²	2,5.10 ⁰	-	-	-	-
U4	2,0.10 ²	1,0.10 ⁰	-	-	-	-

(a) Titulación realizada por Marta Cerdà

(b)+ Presencia en el volumen indicado
- Ausencia en el volumen indicado

Muestras provenientes de Alemania

Muestra	Colifagos somáticos (ufp/ml)	<i>E. coli</i> O157:H7 (ufp/ml)	Presencia/ausencia de fagos portadores de Stx 2 ^(a)			
			Volumen de enriquecimiento			
			10	1	0.1	0.01
A1	5,2.10 ³	9,3.10 ¹	+	+	-	-
A2	5,5.10 ³	8,9.10 ¹	+	+	-	-

(a)+ Presencia en el volumen indicado

- Ausencia en el volumen indicado

Muestras provenientes de Austria

Muestra	Colifagos somáticos (ufp/ml)	<i>E. coli</i> O157:H7 (ufp/ml)	Presencia/ausencia de fagos portadores de Stx 2 ^(a)			
			Volumen de enriquecimiento			
			10	1	0.1	0.01
O1	8,2.10 ³	4,7.10 ¹	-	-	-	-
O2	1,5.10 ⁴	9,7.10 ¹	+	-	-	-

(a)+ Presencia en el volumen indicado

- Ausencia en el volumen indicado

Muestras provenientes de Francia

Muestra	Colifagos somáticos (ufp/ml)	<i>E. coli</i> O157:H7 (ufp/ml)	Presencia/ausencia de fagos portadores de Stx 2 ^(a)			
			Volumen de enriquecimiento			
			10	1	0.1	0.01
F1	ND ^(b)	1,0.10 ³	+	+	+	-
F2	ND	4,3.10 ²	-	-	-	-
F3	ND	4,0.10 ²	-	+	-	-
F4	ND	3,5.10 ¹	+	+	-	-
F5	ND	1,6.10 ²	+	+	-	-
F6	ND	1,6.10 ³	-	+	+	-
F7	ND	<10	-	-	-	-
F8	ND	8,0.10 ¹	-	-	-	-
F9	ND	4,0.10 ²	+	-	-	-
F10	ND	1,2.10 ³	-	-	-	-

(a)+ Presencia en el volumen indicado

- Ausencia en el volumen indicado

(b) No disponible

Muestras provenientes de Holanda

Muestra	Colifagos somáticos (ufp/ml)	<i>E. coli</i> O157:H7 (ufp/ml)	Presencia/ausencia de fagos portadores de Stx 2 ^(a)			
			Volumen de enriquecimiento			
			10	1	0.1	0.01
H1	8,3.10 ³	2,2.10 ¹	-	-	-	-
H2	2,6.10 ⁴	1,0.10 ²	-	-	-	-

(a)+ Presencia en el volumen indicado

- Ausencia en el volumen indicado

Muestras provenientes de Irlanda

Muestra	Colifagos somáticos (ufp/ml)	<i>E. coli</i> O157:H7 (ufp/ml)	Presencia/ausencia de fagos portadores de Stx 2 ^(a)			
			Volumen de enriquecimiento			
			10	1	0.1	0.01
I1	4,2.10 ³	1,4.10 ¹	-	-	-	-
I2	8,2.10 ³	2,7.10 ²	+	-	+	-

(a)+ Presencia en el volumen indicado

- Ausencia en el volumen indicado

Muestras provenientes de España

Muestra	Colifagos somáticos (ufp/ml)	<i>E. coli</i> O157:H7 (ufp/ml)	Presencia/ausencia de fagos portadores de Stx 2 ^(a)			
			Volumen de enriquecimiento			
			10	1	0.1	0.01
E1	3,3.10 ⁴	1,3.10 ¹	-	-	-	-
E2	4,3.10 ⁴	5,8.10 ³	-	-	-	-
E3	1,3.10 ⁵	7,9.10 ²	+	-	-	-

(a)+ Presencia en el volumen indicado

- Ausencia en el volumen indicado

Muestras provenientes de Portugal

Muestra	Colifagos somáticos (ufp/ml)	<i>E. coli</i> O157:H7 (ufp/ml)	Presencia/ausencia de fagos portadores de Stx 2 ^(a)			
			Volumen de enriquecimiento			
			10	1	0.1	0.01
P1	2,5.10 ⁴	1,4.10 ²	-	-	-	-
P2	1,6.10 ⁴	6,6.10 ²	-	-	-	-
P3	2,6.10 ³	1,2.10 ¹	-	-	-	-

(a)+ Presencia en el volumen indicado

- Ausencia en el volumen indicado

Muestras provenientes de Sudáfrica

Muestra	Colifagos somáticos (ufp/ml)	<i>E. coli</i> O157:H7 (ufp/ml)	Presencia/ausencia de fagos portadores de Stx 2 ^(a)			
			Volumen de enriquecimiento			
			10	1	0.1	0.01
SA1	1,2.10 ⁴	2.10 ²	+	+	+	-
SA2	1,5.10 ⁴	1,2.10 ²	-	-	-	-
SA3	1,6.10 ⁴	2,9.10 ²	-	-	-	-
SA4	9,3.10 ³	4,1.10 ²	+	-	-	-
SA5	<1000	<10	-	-	-	-
SA6	5,0.10 ³	3,0.10 ¹	-	-	-	-

(a)+ Presencia en el volumen indicado

- Ausencia en el volumen indicado

Muestras provenientes de Nueva Zelanda

Muestra	Colifagos somáticos (ufp/ml)	<i>E. coli</i> O157:H7 (ufp/ml)	Presencia/ausencia de fagos portadores de Stx 2 ^(a)			
			Volumen de enriquecimiento			
			10	1	0.1	0.01
NZ1	<1000	0	-	-	-	-
NZ2	8,2.10 ²	2,0.10 ¹	+	+	-	-
NZ3	2,0.10 ⁵	9,7.10 ³	+	+	+	-

(a)+ Presencia en el volumen indicado

- Ausencia en el volumen indicado