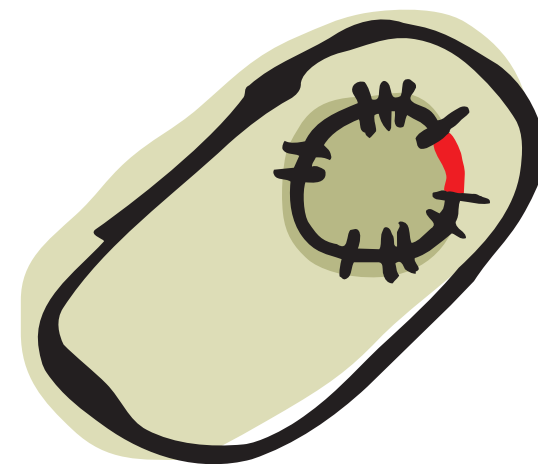




15

QUADERNS DE SALUT PÚBLICA

**Guia**  
**per a la prevenció**  
**i el control**  
**de la infecció per**  
***Escherichia coli* O157:H7**  
**i altres *E. coli***  
**verotoxígenes**



ISBN 84-393-5343-X



9 788439 353430

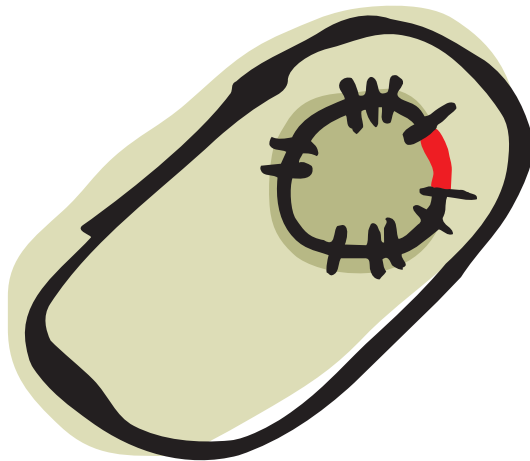

[www.gencat.es/sanitat](http://www.gencat.es/sanitat)

 Generalitat de Catalunya  
 Departament de Sanitat  
 i Seguretat Social

15

QUADERNS DE SALUT PÚBLICA

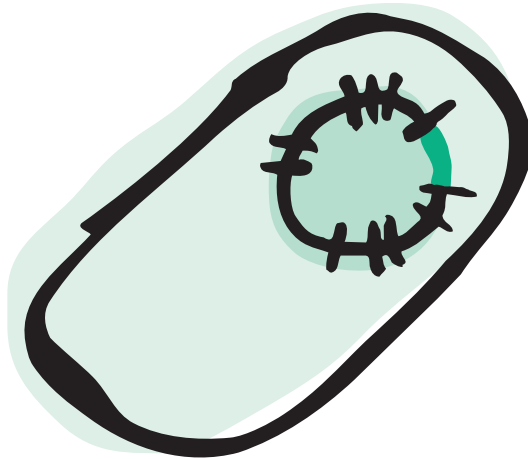
**Guia  
per a la prevenció  
i el control  
de la infecció per  
*Escherichia coli* O157:H7  
i altres *E. coli*  
verotoxígenes**



**15**

QUADERNS DE SALUT PÚBLICA

**Guia  
per a la prevenció  
i el control  
de la infecció per  
*Escherichia coli* O157:H7  
i altres *E. coli*  
verotoxígenes**



Generalitat de Catalunya  
Departament de Sanitat  
i Seguretat Social

Biblioteca de Catalunya. Dades CIP:

---

**Guia** per a la prevenció i el control de la infecció per

Escherichia coli O157:H7 i altres E. coli  
verotoxígenes. – (Quaderns de salut pública ; 15)

ISBN 84-393-5343-X

I. Catalunya. Departament de Sanitat i Seguretat

Social II. Col·lecció: Quaderns de salut pública ; 15

1. Infeccions per escheríchia coli – Prevenció

616.98-084:579.84

---

© Generalitat de Catalunya

**Departament de Sanitat i Seguretat Social**

Edita: Direcció General de Salut Pública

1a. edició: Barcelona, febrer de 2001

Tiratge: 2.500 exemplars

ISBN: 84-393-5343-X

Dipòsit legal: B-3.417-2001

Coordinació editorial: Secció de Publicacions

Correcció de textos: Rosa Chico

Disseny original: Ideograma, S.A.

Adaptació de la coberta i maquetació: Ortega i Palau, S.L.

Impressió: Gràfiques Cuscó, S.A.

## **Direcció de l'edició**

Guillem Prats i Pastor

*Catedràtic de Microbiologia*

*Universitat Autònoma de Barcelona*

## **Coordinació**

Àngela Domínguez i García

*Cap del Servei de Vigilància Epidemiològica*

*Departament de Sanitat i Seguretat Social*

Àngel Teixidor i Canelles

*Subdirector de Protecció de la Salut*

*Departament de Sanitat i Seguretat Social*

## **Autors**

Àngela Domínguez i García

Patricia Gosálvez i Rafel

M. Esperanza Llorens Jové

Teresa Llovet i Pellejero

Beatriz Mirelis Otero

Eva Planes i Magriñà

Guillem Prats i Pastor

José Rodríguez Jerez

## **Revisió**

Josep Álvarez i Rodríguez

Xavier de Benito i Langa

Jorge Blanco Álvarez

Neus Cardeñosa Marín

Glòria Carmona i Parcerisa

Josep M. Corretger i Rauet

Glòria Cugat i Pujol

Dolors Ferrer i Escobar

M. Teresa Jiménez de Anta Losada

Joan Nadal i Amat

Ferran Navarro i Risueño

Helena Pañella i Noguera

Antoni Plasencia i Taradach

## ÍNDEX

<b>Presentació</b>	<b>7</b>
<b>1. La infecció per <i>Escherichia coli</i> O157:H7 com a problema emergent</b>	<b>11</b>
1.1 Acció patògena i evolució	12
1.2 Emergència de la infecció	13
1.3 El descobriment d' <i>E. coli</i> O157 verotoxígena	13
<b>2. <i>Escherichia coli</i>. Aspectes microbiològics</b>	<b>15</b>
2.1 Característiques generals d' <i>E. coli</i>	15
2.2 Concepte d' <i>E. coli</i> enteropatògena	21
2.3 <i>Escherichia coli</i> O157:H7	23
2.4 Altres serotips d' <i>E. coli</i> verotoxígena	36
<b>3. Epidemiologia de les infeccions per <i>E. coli</i> verotoxígena</b>	<b>41</b>
3.1 Epidemiologia descriptiva en humans	41
3.2 Cadena epidemiològica	53
<b>4. Patogènia i clínica de les infeccions per <i>E. coli</i> verotoxígena</b>	<b>63</b>
4.1 Patologia causada per <i>E. coli</i> verotoxígena	63
4.2 Manifestacions clíniques	64
<b>5. Diagnòstic microbiològic</b>	<b>69</b>
5.1 Diagnòstic d' <i>E. coli</i> O157:H7	70
5.2 Protocols de diagnòstic microbiològic d' <i>E. coli</i> verotoxígena	79
5.3 Anàlisi d'aliments. Aspectes legals	82
5.4 Anàlisi epidemiològica. Tècniques de laboratori	83
<b>6. Terapèutica</b>	<b>85</b>
6.1 Tractament de la diarrea	85
6.2 Tractament de la síndrome hemoliticourèmica	88
6.3 Control de les complicacions tardanes de la síndrome hemoliticourèmica	90
<b>7. Mesures per a la prevenció de les infeccions</b>	<b>91</b>
7.1 Bases per a la prevenció i el control	91
7.2 Mesures per prevenir que el microorganisme arribi als aliments	93
7.3 Mesures per destruir o reduir els microorganismes que hi ha als aliments	97

7.4 Reducció de microorganismes en vegetals de consum en cru	100
7.5 Prevenció de la transmissió directa	102
<b>8. Vigilància epidemiològica</b>	<b>105</b>
<b>9. Bibliografia</b>	<b>110</b>
<b>Annexos</b>	
1. Les regles d'or de l'Organització Mundial de la Salut per preparar aliments segurs	139
2. Recomanacions al consumidor	143
3. Actuacions als escorxadors en l'elaboració de preparats de carn i a les indústries càrnies	147
4. Recomanacions als establiments de restauració col·lectiva	151
5. Unitats territorials de vigilància epidemiològica	155
6. Notificació individualitzada de malalties de declaració obligatòria	159
7. Fitxa epidemiològica. Cas de colitis hemorràgica per <i>E. coli</i> verotoxígena	163

## Presentació

Un dels fets més rellevants de la salut pública durant el segle XX ha estat l'extraordinari descens experimentat en la morbiditat i la mortalitat per malalties infeccioses als països actualment desenvolupats.

En la majoria d'aquests països, el declivi de la morbiditat i sobretot de la mortalitat per aquestes malalties s'inicià durant la primera meitat del segle XIX (a Espanya durant la segona meitat i a Suècia a final del XVIII). Tal com MacKeown va exposar a *The role of Medicine: dream, mirage or nemesis?*, publicat a Oxford el 1979, aquest descens, que va precedir en molts països la introducció dels avenços de la higiene pública, es va deure a la millora de l'estat nutritiu de la població com a conseqüència de la major disponibilitat d'aliments i a l'augment general del nivell de vida de la població que va tenir lloc durant aquella època.

La majoria d'autors estan d'acord amb MacKeown en el fet que la millora de la nutrició de la població, i en especial dels lactants i els nens, va ser fonamental per incrementar la resistència inespecífica de l'hoste a la infecció i per reduir la morbiditat i la mortalitat per diarrees infantils, infeccions respiratòries agudes i tuberculosi, que aleshores eren molt elevades, sobretot en l'edat infantil.

La millora de la nutrició i de les condicions de vida van contribuir també, probablement, a la disminució de la mortalitat per xarampió, diftèria, tos ferina i altres malalties de reservori humà i transmissió interhumana pròpies de la infància, però gairebé no va influir en la morbiditat per aquestes malalties.

La introducció, en la segona meitat del segle XIX, de les mesures de sanejament ambiental relatives a l'abastiment d'aigua potable, l'evacuació d'excretes i escombraries, la higiene de la llet i dels aliments, la millora de les condicions dels habitatges i el desenvolupament d'altres normes d'higiene, influïren de manera important sobre la morbiditat i la mortalitat derivades de les infeccions intestinals (el còlera, la febre tifode, la disenteria, les diarrees infantils, etc.), que aleshores eren molt elevades.

Exceptuant les vacunes de la verola i la ràbia, les mesures preventives o terapèutiques específiques no van tenir cap paper rellevant en aquest descens fins al segon terç del segle XX, amb la introducció dels toxoides tetànic i diftèric i el descobriment de les sulfamides i els antibiòtics.

De tota manera, es pot afirmar que aquestes mesures, i especialment les vacunacions sistemàtiques, han estat fonamentals en la reducció extraordinària de la incidència de les malalties contra les quals protegeixen, i sobretot en la seva eradicació a escala mundial (la verola) o eliminació en l'àmbit de països o regions (la diftèria, la poliomièlitis, el xarampió).



La millora va ser tan important que entre els anys seixanta i setanta l'opinió dominant entre els experts era que els avenços mèdics (preventius o terapèutics) permetrien vèncer moltes de les malalties infeccioses i les mantindrien sota control o, fins i tot en alguns casos, s'eliminarien o s'eradicarien.

Malauradament aquestes previsions no s'han complert. Durant els darrers vint anys s'ha produït la reemergència de moltes malalties infeccioses considerades anteriorment en procés de control als països desenvolupats (la tuberculosi), als països de l'est d'Europa (la diftèria) i als països en vies de desenvolupament (la febre groga, el dengue, la pesta, la malària, etc.). Paral·lelament s'han identificat nous agents etiològics de malalties infeccioses (el rotavirus, el virus d'Ebola, la legionel·la, l'hantavirus, el campilobàcter, *Escherichia coli* O157:H7, *Borrelia burgdorferi*, l'HIV, *Helicobacter pylori*, els virus de les hepatitis E i C, *Vibrio cholerae* O139, els prions, etc.) causants de malalties ja conegudes (diarrees, febres hemorràgiques, hepatitis víriques, síndromes respiratòries) i de noves malalties i síndromes clíniques (la sida, una variant nova de la malaltia de Creutzfeldt-Jakob), de les quals algunes s'han constituït com a malalties emergents. D'altra banda, algunes malalties cròniques considerades clàssicament com d'origen no infecciós, s'ha demostrat que són causades bàsicament per un agent infecciós específic. Aquest seria el cas de l'ulcus pèptic i del carcinoma gàstric (*Helicobacter pylori*), del carcinoma hepatocel·lular (virus de les hepatitis B i C), del càncer de coll d'úter (papil·lomavirus), del limfoma de Burkitt i del carcinoma nasofaríngic (virus d'Epstein-Barr), i del sarcoma de Kaposi (herpesvirus associat al carcinoma de Kaposi). Finalment, s'ha formulat la hipòtesi que alguns agents infecciosos (citomegalovirus, *Chlamydia pneumoniae*, *Helicobacter pylori*) poden tenir un paper en l'etiologia de la cardiopatia coronària.

Tot això confirma l'error de les idees mantingudes fa trenta anys i la necessitat de donar prioritat a la lluita contra les malalties infeccioses transmissibles en l'àmbit de la salut pública actual.

El nostre país ha estat especialment afectat per aquesta eclosió de malalties emergents i reemergents. La incidència de la sida ha estat de les més elevades entre els països occidentals, tot i que els darrers anys està declinant clarament. La tuberculosi no ha estat mai controlada, i en la primera meitat dels anys noranta es va produir un agreujament d'aquesta malaltia, en part a causa de la sida, tot i que en els darrers cinc anys la tendència és clarament descendent. Els recents brots comunitaris de legionel·losi esdevinguts el 1996 a Alcalá de Henares (el més important a Europa fins a l'actualitat), el 1999 a Alcoi i el 2000 a Vigo i a Barcelona, l'epidèmia de meningitis meningocòccica de l'any 1997 causada pel serogrup C, el brot

d'hepatitis C de València el 1998, i el brot de toxiinfecció alimentària per *E. coli* O157:H7 que va tenir lloc recentment a Barcelona, són exemples clars i actuals de malalties noves o reemergents que, a més, han tingut un gran impacte social.

La infecció per *Escherichia coli* O157:H7 és un exemple paradigmàtic de malaltia infecciosa emergent. Identificat per primer cop el 1982 com a patògen humà, aquest bacteri ha produït brots de diarrees hemorràgiques a més de trenta països, i en alguns la incidència anual ha arribat a taxes alarmants (8 per 100.000 en algunes regions d'Escòcia, Canadà i els Estats Units). En un 5 % dels casos es produeix la síndrome hemoliticourèmica com a complicació de la infecció, fet que incrementa la importància d'aquesta afecció com a problema de salut pública. La malaltia és prevenible si es prenen les mesures preventives adequades als escorxadors i en tot el procés de preparació i cocció de la carn.

A Catalunya, la incidència de la malaltia ha estat negligible durant molts anys. Prats i col., en un estudi recent, només pogueren identificar setze casos esporàdics durant els darrers deu anys.

El brot esdevingut a Barcelona, que ha afectat 181 persones (de les quals sis van presentar síndrome hemoliticourèmica) de quatre escoles servides per la mateixa empresa de *catering*, és un exemple que cap país queda lliure, amb el temps, de les malalties emergents.

La *Guia per a la prevenció i el control de la infecció per E. coli O157:H7 i altres E. coli verotoxígenes* que tinc l'honor de presentar ha estat elaborada per oferir als professionals sanitaris i de la indústria alimentària una actualització de l'epidemiologia i les mesures de prevenció i control d'aquesta infecció. Espero i desitjo que els sigui d'utilitat en el treball diari professional i que contribueixi a minimitzar el risc i la incidència d'aquesta greu infecció emergent.

Finalment, el meu agraïment més sincer als experts que dirigits pel professor Guillem Prats han col·laborat en la redacció de la guia i han culminat el treball en un temps rècord pel que són aquest tipus de publicacions. Poden estar segurs que el Departament de Sanitat i Seguretat Social valora molt positivament el treball realitzat i durà a terme tots els esforços necessaris perquè la guia arribi puntualment a tots els professionals de la indústria alimentària i la sanitat implicats en la prevenció de les intoxicacions alimentàries i, en especial, de la nova malaltia emergent objecte de la guia.

**Lluís Salleras**

Director general de Salut Pública

## 1. La infecció per *Escherichia coli* O157:H7 com a problema emergent

Durant les dècades dels seixanta i setanta, en bona part a causa de l'èxit obtingut en la profilaxi de les malalties prevenibles mitjançant la vacunació, així com també per la disponibilitat d'antibiòtics, molts professionals de la medicina pensaven que les malalties infeccioses havien deixat de ser un problema important de salut, i que des d'aleshores s'havien de prioritzar les activitats preventives i curatives entorn d'altres malalties (1-4).

Malauradament, aquestes opinions no s'ajustaven a la realitat existent ni tenien en compte la plasticitat del món microbià. Les malalties infeccioses i parasitàries suposen encara la primera causa de mortalitat a escala mundial, ja que comporten el 33 % de totes les defuncions, seguides per les malalties de l'aparell circulatori amb el 29 %, i el càncer amb el 12 % (5).

De fet, aquelles idees tan optimistes es van debilitar quan des de final dels setanta van aparèixer noves malalties infeccioses entre les quals destaca la sida (1983). Els últims vint-i-cinc anys s'ha identificat un nombre important de nous agents causals de processos infecciosos, alguns dels quals es recullen a la taula 1 (1, 3, 5).

Fent referència específica als bacteris, l'emergència d'un nou patògen es pot produir per algun d'aquests dos processos: o bé el microorganisme ja tenia els factors de virulència tot i que només recentment ha contactat amb l'home (com pot haver succeït amb la legionel·la), o bé el nou patògen s'ha construït sobre una soca no virulenta mitjançant un procés d'incorporació de gens que codifiquen factors de virulència (6). Hi ha una segona fase en la qual es produeix la difusió del microorganisme, i quan la transmissió del nou patògen és prou eficient apareix un nombre important de casos de la malaltia, que constitueix un problema emergent.

En tot cas, les circumstàncies que permeten contactar amb els microorganismes patògens, com viatges, hàbits de conducta i d'altres, així com les que permeten la introducció d'una nova soca patògena en els sistemes de distribució d'aigües o aliments, fan que una gran quantitat de persones susceptibles s'exposin al nou agent i aleshores resulti evident la seva acció patògena.

*Escherichia coli* serotip O157:H7 és un bon exemple d'aquest doble procés de construcció i emergència d'un nou patògen, com es descriu més endavant (7-9).

## Taula 1. Alguns microorganismes emergents

Exemples d'agents etiològics de malalties infeccioses identificats els últims 25 anys.

Any	Agent	Malaltia
1975	<i>B 19 virus</i>	Quinta malaltia
1976	<i>Cryptosporidium parvum</i>	Enterocolitis
1977	<i>Zaire Ebola virus</i> (ZEBOV) <i>Legionella pneumophila</i> <i>Hantaan virus</i>  <i>Campylobacter</i> <i>Clostridium difficile</i>	Febre hemorràgica d'Ebola Malaltia dels legionaris Febre hemorràgica amb síndrome renal Gastroenteritis Gastroenteritis
1982	<i>Escherichia coli</i> O157:H7  <i>Borrelia burgdorferi</i>	Gastroenteritis. Síndrome hemolítica-urèmica Malaltia de Lyme
1983	<i>Helicobacter pylori</i> Virus de la immunodeficiència humana (HIV-1 i HIV-2)	Úlcus gàstric  Sida
1986	<i>Cyclospora cayetanensis</i>	Diarrea persistent
1988	Herpesvirus humà 6 (HHV-6)	Exantema sobtat
1989	Virus de l'hepatitis C (HCV)	Hepatitis
1992	<i>Vibrio cholerae</i> O139	Còlera
1995	Herpesvirus humà 8 (HHV-8)	Sarcoma de Kaposi
1996	Prió de l'encefalopatia esponjiforme bovina	Nova variant de la malaltia de Creutzfeldt-Jakob

Font: Satcher (1) i McDade (3) modificada.

### 1.1 Acció patògena i evolució

*Escherichia coli* del serotip O157:H7, i amb menys freqüència d'altres serotips, com l'O26:H11 i l'O111:H, causen gastroenteritis de gravetat variable amb hemorràgies característiques, per la qual cosa s'han anomenat *E. coli* enterohemorràgiques. L'enteritis per *E. coli* enterohemorràgica pot donar lloc a complicacions molt greus, fins i tot mortals, com són la síndrome hemolítico-urèmica i la púrpura trombòtica trombocitopènica.

La capacitat patogènica d'*E. coli* enterohemorràgica es deu a diversos factors de virulència, però el més important és la producció d'una toxina anomenada verotoxina (VT) després que les soques s'hagin adherit íntimament a l'epiteli intestinal. Aquest tipus d'adherència és diferent de la de les soques comensals, no patògenes, i per ella mateixa és capaç de produir diarrea. De fet, aquest és el mecanisme patogènic propi d'unes soques d'*E. coli* causants d'enteritis descrites als anys quaranta a Anglaterra que es van anomenar *E. coli* enteropatògenes. L'adquisició per part d'algunes d'aquestes soques dels gens que codifiquen la verotoxina, gens que

estan vehiculats en bacteriòfags, explica la construcció d'aquests microorganismes, que sense dubte no és recent, però que han estat detectats quan s'han difós àmpliament, fonamentalment arran dels hàbits actuals de cria dels animals i de consum d'aliments carnis (2,9).

## 1.2 Emergència de la infecció

*E. coli* O157:H7, que és el serotip causant d'enteritis hemorràgica més freqüent, s'ha aïllat en el bestiar boví, tant en el sa com en el malalt, encara que no és patògen per als bovins adults ja que es comporta com un microorganisme comensal. També altres rumugants com ovins i caprins són reservori d'aquest microorganisme.

La investigació dels brots que s'han anat produint a partir del 1982 ha demostrat que els aliments, la llet no pasteuritzada i l'aigua són vehicles apropiats per a la transmissió d'*E. coli* O157:H7. A partir d'aquests brots es va sospitar que la dosi infectant devia ser molt baixa, la qual cosa es va confirmar amb l'observació que els casos secundaris que es produeixen per contacte fecal-oral entre una persona infectada i una persona sana són relativament freqüents.

S'han proposat diverses hipòtesis que justifiquen la difusió d'aquest serotip d'*E. coli*, com la cria massiva dels animals d'abast, la fertilització de les pastures amb fems, la desaparició parcial de la brucel·losi, o la particular fisiologia digestiva dels rumugants. Aquestes factors han estat revisats per Armstrong *et al.* (9).

També s'ha observat que la introducció d'alimentació programada per ordinador s'ha associat a l'increment de la infecció per *E. coli* O157:H7 en el bestiar, però probablement l'agrupament en grans unitats i la facilitat de transmissió que va lligada a aquesta tecnologia podria explicar el fet (10).

Un factor determinant per a la propagació d'*E. coli* O157:H7 mitjançant vehicles molt diversos és la seva tolerància als àcids, superior a la d'altres grups d'*E. coli* (11-13). Aquesta propietat permetria que *E. coli* O157:H7 sobrevisqués en aliments d'una gran acidesa.

Així doncs, les dades disponibles indiquen que *E. coli* O157:H7 és un microorganisme que va evolucionar fins a adquirir uns mecanismes patogènics d'una gran virulència i ha emergit per la facilitat de difusió basada en les raons que s'han esmentat.

## 1.3 El descobriment d'*E. coli* O157 verotoxigena

L'any 1977, Konowalchuk *et al.* (14) estudiaven la toxina termolàbil d'*E. coli* i van comunicar l'observació que diferents soques d'*E. coli* aïllades de malalts amb enteritis produïen una toxina diferent de la termolàbil que do-

nava lloc a una lesió intensa i irreversible sobre la línia cel·lular Vero, la qual van denominar verotoxina. Cal assenyalar que l'acció enterotòxica d'aquesta toxina havia estat constatada el 1971 per Smith i Lingood (15) sense que se'n continués l'estudi. El treball de Konowalchuk *et al.* sí que es va continuar amb dos estudis prospectius en malalts amb diarrea per determinar la presència de soques productores de verotoxina, però no es va arribar a conclusions definitives respecte a la seva acció (16,17).

El 1983, Riley *et al.* van demostrar que dos brots de colitis hemorràgica apareguts a Oregon i Michigan, als Estats Units, estaven causats per un serotip infreqüent d'*E. coli*, l'O157:H7 (18).

Johnson *et al.*, el 1983, comuniquen que un brot de colitis hemorràgica a Ontario (Canadà) està causat pel mateix serotip d'*E. coli* que el trobat als Estats Units per Riley *et al.*, i demostraren que és productor de verotoxina (19). Poc després O'Brien *et al.* confirmen que les soques del brot americà també són productores de verotoxina (20). De fet, el grup d'O'Brien feia poc temps que havia demostrat la identitat de la verotoxina produïda per una de les soques estudiades per Konowalchuk *et al.* (14) amb la toxina de Shiga produïda per *Shigella dysenteriae* serotip 1 (21).

Entre 1983 i 1985, Karmali *et al.* van mostrar l'associació epidemiològica entre les soques productores de verotoxina i la síndrome hemoliticourèmica (22, 23). La importància patogènica de la verotoxina es va reforçar amb la detecció d'anticossos contra ella en els malalts amb la síndrome hemoliticourèmica i l'associació entre aquest procés i soques productores de verotoxina de diferents serotips.

Finalment, el 1983 es demostra que la verotoxina a *E. coli* està codificada en gens vehiculats per bacteriòfags lamboides capaços d'incorporar-se (lisogenitzar) al genoma d'*E. coli* (24, 25). Hi ha diverses revisions sobre *E. coli* enterohemorràgica (9, 12, 26-32).

## 2. *Escherichia coli*. Aspectes microbiològics

### 2.1 Característiques generals d'*E. coli*

*E. coli* és un bacteri que es troba en gran abundància al tub digestiu de l'home i dels animals de sang calenta, on té el seu reservori natural (33-35). Forma part, juntament amb altres bacteris aerobis i anaerobis, de la flora intestinal normal, la qual, en conjunt, realitza diverses funcions fisiològiques per a l'hoste, com són el processament dels residus alimentaris, la síntesi de factors nutritius essencials, l'estímul antigènic i d'altres que no han estat ben precisades. És l'espècie aeròbia més abundant del tub digestiu humà i ha estat considerat tradicionalment com un bacteri no patògen (36).

*E. coli* va ser aïllat per primera vegada per Theodor Escherich el 1885 (37). Per la facilitat del cultiu i pel seu caràcter de bacteri no patògen s'ha utilitzat com a model per a l'estudi de l'estructura i la fisiologia cel·lular. Tant és així que avui és, sens dubte, l'ésser viu més ben conegut des del punt de vista biològic (38).

Les característiques biològiques de les soques verotoxigènes d'*Escherichia coli* són les pròpies de l'espècie, i excepte pel que fa als factors de virulència, es poden observar poques diferències entre les soques patògenes i les comensals.

#### 2.1.1 Estructura

*Escherichia coli* és un bacil gramnegatiu aerobi i anaerobi facultatiu amb una grandària d'entre 1-2  $\mu$  d'ample i 2-6  $\mu$  de llarg. Té l'estructura característica dels bacils gramnegatius (39), amb un citoplasma ple de ribosomes; el material genètic està constituït per DNA bicatenari, que forma una anella circular covalentment tancada que constitueix el cromosoma, del qual només hi ha una còpia. Aquest cromosoma està condensat formant el nucleoide (40) (figura 1).

Aquesta espècie és hoste de diversos bacteriòfags, alguns dels quals es poden integrar al cromosoma del bacteri aportant gens addicionals (lisogènia). *E. coli* també incorpora, sovint, petits fragments de DNA que adquireixen forma circular anomenats plasmidis, que generalment romanen lliures al citoplasma (41, 42). Ambdós tipus de material genètic exogen —fags i plasmidis— poden codificar productes molt importants per al microorganisme, com enzims inactivants d'antibiòtics, enzims amb activitats metabòliques que permeten la utilització de nutrients nous, factors estructurals com fimbries (adhesines) i també factors patogènics per a l'hoste com toxines i d'altres.

Les verotoxines produïdes per *E. coli* O157:H7 i altres serotips estan codificades en soques lisogèniques. Els fags integrats (lisogènics) i els plasmidis es multipliquen sincrònicament amb el cromosoma bacterià, passen a la descendència però també a altres bacteris per processos com la transducció i la conjugació, respectivament.

Exterior a la membrana cel·lular que limita el citoplasma, el qual conté els elements que s'acaben d'esmentar, els bacteris tenen una paret característica molt resistent però flexible formada per un entramat de fibres (com els vímets d'un garrafó). Les fibres són, des del punt de vista químic, un llarg polisacàrid, i estan unides entre si per un petit pèptid, d'aquí que aquesta estructura s'anomeni peptidoglicà. En els bacteris gramnegatius com *E. coli*, per fora del peptidoglicà, tot i que unit a ell i constituint un element solidari i propi de la paret, es troba una membrana d'estructura fosfolipídica típica però amb abundants molècules de lipopolisacàrid a la capa externa (38, 39, 43).

Algunes soques d'*E. coli*, per fora de la paret poden tenir una càpsula d'estructura polisacàrida i un gruix variable (39, 44).

*E. coli*, com altres bacteris, compta amb flagels d'estructura proteica que són responsables de la seva mobilitat. Són elements filamentosos ancorats a la membrana citoplasmàtica amb una llargada que és diverses vegades la del bacteri (39, 45).

Les fimbries (*pili*) són estructures filamentosos proteiques semblants als flagels, encara que generalment més prims. La seva composició és complexa: l'extrem distal s'uneix a estructures específiques de les diverses cèl·lules epitelials; així, hi ha fimbries d'*E. coli* que s'uneixen a receptors de les cèl·lules intestinals, d'altres a les de l'epiteli urinari, etc. Les fimbries són, per tant, adhesines que expliquen l'ecologia del bacteri (46). *E. coli* també posseeix adhesines no fimbriades (figura 1).

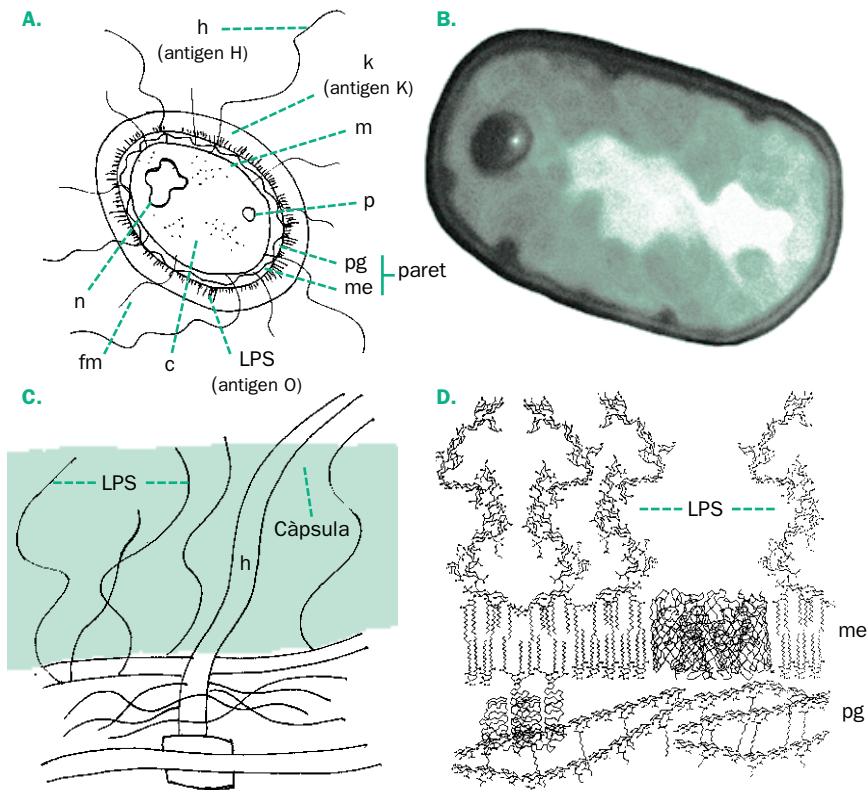
### 2.1.2 Metabolisme i cultiu

*Escherichia coli* no és un bacteri exigent des del punt de vista nutritiu. La via metabòlica fermentativa (anaeròbia) transforma la glucosa en àcid pirúvic i pot continuar amb la fermentació acidomixta, que acaba en àcid acètic, àcid làctic i àcid succínic. Aquesta via, pobra des del punt de vista energètic, en presència d'oxigen continua des del pirúvic al CO<sub>2</sub> mitjançant el cicle de Krebs i les cadenes respiratòries, i genera, aleshores, gran quantitat d'energia (39).

Amb la glucosa com a font d'energia, i carboni i una font de nitrogen com el nitrat potàssic, *E. coli* pot sintetitzar totes les estructures necessàries per al seu creixement i replicació (39). És per això que aquest bacteri creix de manera exuberant en medis de cultiu usuals de formulació senzilla com



## Figura 1. Estructura d'*Escherichia coli*



Es representa l'estructura d'un bacteri gramnegatiu típic com *Escherichia coli*.

A: diagrama del bacteri.

B: microfotografia electrònica.

C: diagrama de l'estructura de la membrana cel·lular i la paret. També s'ha representat un flagel i la càpsula.

D: representació esquemàtica de l'estructura molecular de la paret. No s'ha representat la membrana cel·lular, el flagel ni la càpsula.

c: citoplasma.

n: nucleòide.

m: membrana cel·lular.

pg: peptidoglucà de la paret.

me: membrana externa de la paret.

LPS: lipopolisacàrid.

k: càpsula.

h: flagel.

fm: fimbria.

Equivalents antigènics: càpsula: antigen K; LPS: antigen O; flagels: antigen H.

una simple infusió de carn. La temperatura òptima de creixement és de 37 °C, encara que ho fa entre els límits de 10 °C a 45 °C.

Sota aquestes condicions (medi usual i incubació a 37 °C en aerobiosi) el temps de generació és molt curt, al voltant de vint minuts, per la qual cosa un medi líquid inoculat després d'una nit d'incubació apareix completament tèrbol, i en un medi sòlid es formen colònies de 2 a 5 mm de diàmetre, que són observables a simple vista.

### 2.1.3 Identificació

*E. coli* és una espècie del gènere *Escherichia*, que és un dels més de trenta gèneres de la família *Enterobacteriaceae*. Aquesta família es defineix per estar formada per bacils gramnegatius aerobis i anaerobis facultatius, no esporulats, que creixen bé en medis usuals, són oxidasanegatius, redueixen els nitrats a nitrits i són mòbils mitjançant flagels perífrics o immòbils (34, 47-49).

Dintre d'aquesta família els diferents gèneres i espècies s'han definit per la seva homologia (o diferència) genètica mitjançant tècniques d'hibridació DNA-DNA. Les dades obtingudes per aquest mètode i les classificacions que se n'han derivat han estat, en general, coincidents amb les classificacions que s'havien fet prèviament basades en les diferents característiques metabòliques dels membres d'aquesta família (50).

Així doncs, les proves metabòliques permeten identificar la majoria d'espècies de la família. És interessant assenyalar, però, que encara que l'espècie *E. coli* és metabòlicament diferent de les espècies del gènere *Shigella* (*S. dysenteriae*, *S. sonnei*, *S. flexneri*, *S. boydii*), en estudis d'hibridació s'ha vist que les cinc espècies (*E. coli* i les quatre de *Shigella*) formen en realitat una única genoespècie, encara que per raons històriques aquest fet no s'ha reflectit en la nomenclatura.

Les característiques metabòliques pròpies d'*E. coli* permeten diferenciar-la d'altres espècies d'enterobacteris que s'aïllen freqüentment en clínica.

### 2.1.4 Classificació infraespecífica

A mesura que s'ha vist que *E. coli* no era una espècie estrictament comensal, com es va pensar inicialment, sinó que, com es veurà més endavant, algunes soques poden produir processos patològics, ha interessat dividir l'espècie en grups infraespecífics, particularment per tractar de correlacionar aquests grups establerts per tècniques de laboratori amb els diversos grups definits pel seu potencial patogen.

Dins d'aquesta espècie, el biotipat, serotipat i genotipat són els mètodes de classificació infraespecífica més utilitzats; contràriament, el fagotipat o bacteriocintipat són en general poc emprats, encara que s'utilitzen en àmbits específics (p. ex.: fagotipat per *E. coli* O157:H7).

## Biotipat

L'espècie es pot subdividir en biotips en funció d'alguns caràcters bioquímics. En efecte, determinades reaccions bioquímiques són constants a *E. coli* i de fet són les que permeten identificar l'espècie, però d'altres són variables (positives o negatives) segons les soques, per la qual cosa es poden utilitzar per diferenciar biotips dintre de l'espècie (49, 51, 52). Les proves metabòliques utilitzades per biotipar *E. coli* són la lisina i l'ornitina descarboxilases, la producció de gas a partir de la glucosa, la fermentació de la lactosa, la sacarosa, el dulcitol, la rafinosa, la ramnosa, el sorbitol, l'adonitol i la sorbosa, així com la  $\beta$ -glucuronidasa.

## Serotipat

La classificació immunològica (serològica) d'*E. coli* es fa en funció de tres estructures antigèniques prèviament descrites: el lipopolisacàrid, la càpsula i els flagels.

L'antigen del lipopolisacàrid (LPS) s'anomena O. En el moment actual s'han descrit més de cent setanta antigens O diferents (O1, O2, O3,...). Quan una soca d'*E. coli* es classifica determinant únicament l'antigen O (p. ex.: O111, O157) s'està dividint l'espècie en serogrupos. Les soques que no tenen LPS o de les quals la síntesi és incompleta acostumen a aglutinar espontàniament en solució salina (autoaglutinació) i es defineixen com a soques rugoses (R, *rough* en anglès) (48, 53, 54).

Una altra estructura antigènica utilitzada per a la classificació serològica d'*E. coli* és l'antigen capsular, d'estructura polisacàrida, anomenat antigen K (53, 55, 56). Es coneixen més de cent antigens K diferents. No totes les soques d'*E. coli* formen càpsula.

La darrera estructura antigènica utilitzada per a la classificació serològica d'*E. coli* és l'antigen flagel·lar, que té estructura proteica (57). Aquest antigen s'anomena H i en la actualitat se'n coneixen més de 56 variants immunològiques. Hi ha soques naturalment immòbils i variants immòbils de soques mòbils.

Quan una soca es defineix serològicament per l'antigen O, el K i l'H, s'ha determinat el serotip de la soca. Així doncs, un serogrup (definit per l'antigen O) inclou diversos serotips. En general, i en una primera aproximació, un serotip defineix un clon d'*E. coli*.

La citació del serogrup és O15, O111, O157, etc., mentre que la del serotip incorpora els tres antigens: O15:K52:H1, O111:H2, O111:H12, O111:H21, O111:H<sup>-</sup>, O157:H7, etc. (s'ha de veure que hi ha soques no capsulades sense antigen K, i que s'han posat com a exemples diversos serotips del serogrup O111 entre els quals n'hi ha un sense antigen H).

### **Fagotipat**

El fagotipat d'una soca es produeix, mitjançant un panell de bacteriòfags, estudiant la susceptibilitat de la soca als bacteriòfags del panell (58).

El fagotipat és un sistema de tipat infraespecífic molt utilitzat abans de la difusió de les tècniques actuals de biologia molecular. És un sistema senzill de realitzar que permet estudiar un nombre important de soques en poc temps, per la qual cosa és un mètode de tipat suggerit per fer-lo servir inicialment davant d'un brot, a diferència dels mètodes genètics, que requereixen instrumental especial i que són difícils d'estandarditzar. El requeriment de mantenir el panell de fags al laboratori, però, fa que aquesta tècnica sigui enutjosa per emprar-la en el laboratori de diagnòstic i que només es faci servir en centres de referència.

### **Genotipat**

Els marcadors assenyalats anteriorment (biotipat, serotipat i fagotipat) són marcadors fenotípics, alguns dels quals, com els que estudien serovarietats o el fagotipat, requereixen disposar de reactius (antisèrums o fags, respectivament) de preparació complexa o manteniment laboriós i diferents per a cada espècie microbiana. Per això els darrers anys les tècniques de classificació infraespecífica basades en l'estudi del genoma han facilitat la introducció de tècniques que un cop posades a punt són aplicables a diversos microorganismes, en les quals s'utilitzen els mateixos reactius i procediments, i que després d'estandarditzades són relativament senzilles de dur a terme (59, 60). En un treball publicat per Arbeit el 1999 es pot trobar una revisió breu i clara d'aquestes tècniques (61).

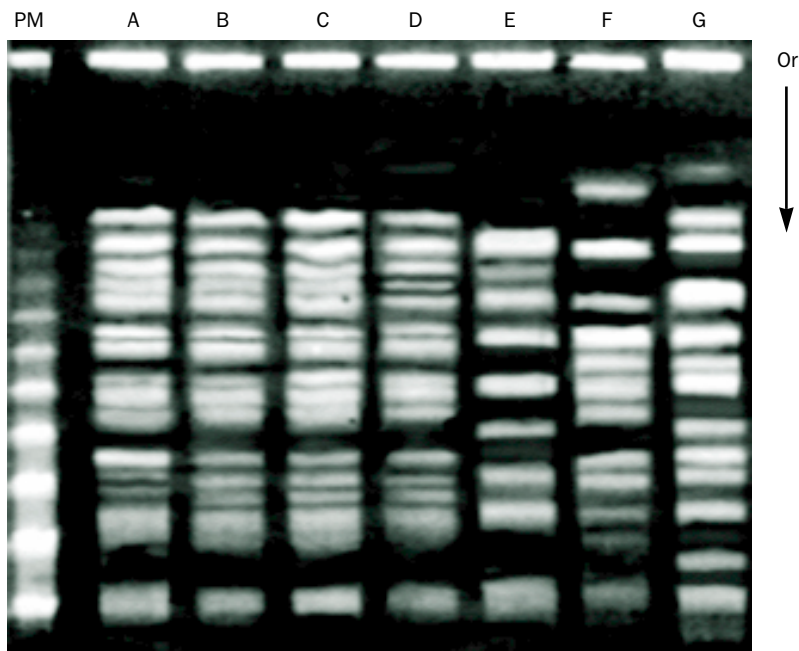
L'electroforesi en camp pulsant (*pulsed field gel electrophoresis*, PFGE) és la tècnica de genotipat més utilitzada per a *E. coli* (62). Es basa a alliberar el DNA de cada bacteri amb una solució de lisi, tallar-lo mitjançant enzims de restricció i comparar els fragments de DNA obtinguts a cadascun dels bacteris, observant les bandes que es formen per electroforesi en un gel sotmès a pulsacions elèctriques. El camp elèctric pulsant s'utilitza per analitzar un DNA que, pel fet que ha estat tallat amb enzims de baixa freqüència de tall, com per exemple *Xba* 1 per a *E. coli* O157:H7, donarà lloc a uns pocs fragments de grans dimensions que no es poden desplaçar en un gel sotmès a un camp elèctric continu convencional (figura 2).

### **Altres tècniques de tipat**

El perfil plasmídic s'ha utilitzat per tipar diverses espècies bacterianes incloent *E. coli*. Té nombroses deficiències, la més important és probablement la inestabilitat dels plasmidis (63).

Entre els marcadors epidemiològics utilitzats específicament per a *E. coli* O157:H7 diferents dels assenyalats anteriorment hi ha el tipat de les toxi-

**Figura 2. *E. coli*. Fragments de restricció PFGE**



Es poden observar els fragments de DNA d'*E. coli* tallats per l'enzim de restricció *Xba* 1, que s'han desplaçat des de l'origen (Or) en la direcció de la fletxa; els fragments majors es desplacen menys que els més petits, que avancen més.

PM: marcador de pes molecular.

A, B, C i D: soques d'un mateix brot (Barcelona, 2000).

E, F i G: soques de casos esporàdics.

Font: Servei de Microbiologia. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Barcelona.

nes, que té les seves limitacions ja que només existeixen cinc variants majors i en algunes àrees geogràfiques una d'elles pot ser molt predominant (64, 65).

## **2.2. El concepte d'*E. coli* enteropatògena**

Actualment algunes soques d'*Escherichia coli* es consideren patògenes (34, 66). Un primer grup està constituït per les soques que causen gastroenteritis i per a les quals s'han descrit diversos mecanismes d'enteropatogenicitat (67). Un altre grup està constituït per les soques uropatògenes, definides per la freqüència amb què es detecten en les infeccions urinàries i perquè tenen diversos factors d'urovirulència (68). Finalment es

considera un grup de soques patògenes causants de sèpsia neonatal i en particular de meningitis (69).

El fet que a cada grup patogènic només es trobin alguns serotips d'*E. coli* es considera com una constatació que les soques patògenes són clons amb factors de virulència específics (taula 2)

Els estudis en voluntaris emprant diferents soques enteropatògenes d'*E. coli* i l'experimentació *in vitro* i amb models animals han permès definir amb precisió cinc grups diferents: *E. coli* enteroinvasiva, *E. coli* enterotoxígena, *E. coli* enteropatògena, *E. coli* enterohemorràgica, i *E. coli* enteroagregativa.

Les soques enteroinvasives d'*E. coli* tenen els mateixos factors de virulència que les shigel·les (67, 70, 71), però compten amb caràcters metabòlics i antigènics que les acosten més a *E. coli* que a les shigel·les (encara que ambdós grups de microorganismes constitueixen una gènespecie única).

## Taula 2. Serogrupos d'*Escherichia coli* associats a infecció en humans

S'assenyalen alguns dels serogrupos d'*E. coli* que formen part de la flora comensal normal i d'altres associats a diversos processos patològics humans. Dins de cadascun d'aquests serogrupos només alguns serotips causen patologia.

Flora normal	ECEPc	ECET		ECEI	ECEH <sup>1</sup>	Meningitis neonatal	Infecció del tracte urinari	Septicèmia
01	026	06	0114	028	0157	01	01	01
02	055	08	0115	029		06	02	02
04	086	011	0126	0112		07	04	04
05	0111	015	0128	0115		016	06	06
06	0114	020	0148	0124		018	07	07
07	0119	025	0149	0135		083	08	08
08	0125	027	0153	0136			09	09
018	0126	049	0159	0143			011	011
020	0127	063	0166	0152			016	018
025	0128	078	0167	0164			018	022
045	0142	085	0169	0167			022	025
081	0158						025	075
							062	
							075	

1. Els serotips associats a patologia per producció de verotoxina són l'O157:H7 i els assenyalats a la taula 3.

ECEPc: *E. coli* enteropatògena clàssica.

ECET: *E. coli* enterotoxígena.

ECEI: *E. coli* enteroinvasiva.

ECEH: *E. coli* enterohemorràgica.

Font: Sussman (66).

Les soques d'*E. coli* enterotoxígenes causen gastroenteritis per la producció d'enterotoxines específiques, una de termolàbil (LT) i una altra de termoestable (ST). Aquestes toxines estan codificades en plasmidis (67, 72, 73).

Les soques d'*E. coli* enteropatògena causen diarrea com a conseqüència d'un tipus d'adherència específica a l'epiteli intestinal mitjançant una adhesina proteica no fimbriada anomenada intimina, codificada al gen *eae*. Aquest tipus d'adherència produeix alteracions en les cèl·lules intestinals caracteritzades per l'esborrament de les microvellositats dels enteròcits (lesió d'*attaching and effacing*). Aquestes soques, descrites els anys quaranta i cinquanta, van ser les primeres soques d'*E. coli* amb les quals es va demostrar capacitat de produir gastroenteritis, per això es van conèixer sota la denominació genèrica d'*E. coli* enteropatògenes. Nosaltres, per diferenciar-les dels altres grups d'*E. coli* enteropatògenes descrits posteriorment, preferim denominar-les *E. coli* enteropatògenes clàssiques (67, 74, 75).

Les soques d'*E. coli* enterohemorràgiques inicien la lesió intestinal i els símptomes d'enteritis mitjançant un procés d'adherència idèntic al d'*E. coli* enteropatògena clàssica, seguit de la producció de toxines específiques anomenades verotoxines que són citotòxiques i que expliquen la gravetat de la infecció causada per aquest microorganisme.

Finalment, hi ha un grup que causa diarrea per un mecanisme desconegut. S'ha associat amb diarrees persistents (76). Aquest grup es caracteritza per presentar un patró d'adherència formant agregats característics a la superfície de les cèl·lules de la línia HEP-2, per la qual cosa s'ha denominat *E. coli* enteroagregativa (67).

Al nostre país, les soques dels diversos grups d'*E. coli* enteropatògena es detecten excepcionalment; la majoria d'aquestes soques s'aïllen en casos de diarrea del viatger (77, 78). La freqüència amb què es detecten casos esporàdics per *E. coli* O157:H7 és també molt baixa (79).

### 2.3 *Escherichia coli* O157:H7

La primera vegada que es va correlacionar *E. coli* del serotip O157:H7 amb una gastroenteritis va ser als brots d'enteritis hemorràgica apareguts a Oregon i Michigan l'any 1982. Aleshores era un serotip aïllat poc sovint en infeccions humanes (18).

Posteriorment es va reconèixer que aquest serotip produeix verotoxina, i que a més de causar colitis hemorràgica, també podia ocasionar la síndrome hemolíticourèmica (22, 23).

Més tard es va veure que altres serotips d'*E. coli* també podien causar enteritis i síndrome hemolíticourèmica per producció de verotoxina (80), però aviat va quedar palès que aquest serotip O157:H7 (i la seva variant immòbil, O157:H<sup>-</sup>) era el més freqüentment implicat tant en els casos esporà-

dics com en brots epidèmics, tot i que en algunes regions del món, circumstancialment, podien predominar altres serotips (80-82).

*E. coli* O157:H7 constitueix un serotip d'*E. coli* que té característiques clòniques, la qual cosa comporta que aquest grup de microorganismes tingui característiques comunes, a part, òbviament, del serotip. Entre aquestes característiques hi ha el fet que la majoria de les soques, a diferència d'altres serotips d'*E. coli*, no fermenten el sorbitol ni produeixen  $\beta$ -glucuronidasa (83, 84), són resistents als àcids i, a més, tenen un conjunt de factors de virulència relacionats amb la patogenicitat.

Aquest microorganisme, però, presenta les característiques estructurals i bioquímiques pròpies de l'espècie *E. coli*: fermenta la glucosa amb producció de gas per la via acidomixta; té, per tant, la prova de Voges-Proskauer negativa; no pot utilitzar el citrat com a font de carboni; produeix indole, no produeix ureasa, fenilalaninadesaminasa ni desoxiribonucleasa; descarboxila la lisina; fermenta la lactosa i és, per tant,  $\beta$ -galactosidasa positiva, fermenta també el mannitol, però no ataca l'inositol (34, 47).

Les soques d'*E. coli* O157:H7 causen típicament enteritis hemorràgica, encara que alguns malalts infectats per aquests microorganismes pugín presentar un quadre d'enteritis benigna sense sang o fins i tot una infecció clínicament asimptomàtica. L'enteritis per aquest serotip d'*E. coli* pot causar complicacions com la síndrome hemolíticourèmica i la púrpura trombòtica trombocitopènica.

Aquesta capacitat patogènica és deguda a la presència de diversos factors de virulència que actuen d'una manera coordinada; els més importants són el sistema d'adherència mitjançant la intimina i la producció de verotoxines. La participació d'altres factors de virulència com l'enterohemolisina no ha estat precisada.

Hi ha soques d'*E. coli* O157 no patògenes per manca d'algun dels factors de virulència essencials. D'altra banda, com ja s'ha esmentat, hi ha soques d'altres serotips d'*E. coli* que causen la malaltia perquè compten els factors de virulència assenyalats (taula 3) (80-82, 85).

Des del punt de vista patogènic cal diferenciar les soques d'*E. coli* verotoxígenes, que són totes les que produeixen verotoxina, de les enterohemorràgiques, que són un subgrup de les verotoxígenes que pel fet que tenen, a més, els altres factors de virulència, com el sistema d'adherència específic, poden causar la malaltia.

### 2.3.1. Factors de virulència

#### *Intimina*

El sistema d'adherència de les soques enterohemorràgiques d'*E. coli* a les cèl·lules de l'epiteli intestinal (enteròcits) és un sistema molt complex, fo-



**Taula 3. Serotips d'*E. coli* enterohemorràgica diferents de l'O157:H7**

O2:H5, H6	O48:H21	O111:H2, H8, H <sup>-</sup> *	O125:H <sup>-</sup>
O4:H10, H <sup>-</sup>	O50:H7, H <sup>-</sup>	O112:H2*	O128:H2, H25, H <sup>-</sup>
O5:H <sup>-</sup>	O55:H6, H7, H10, H <sup>-</sup>	O113:H2, H21*	O145:H25, H28*, H <sup>-</sup> *
O6:H2, H <sup>-</sup>	O86:H40	O114:H4	O146:H8, H21*
O18:H7	O91:H10, H21, H <sup>-</sup> *	O115:H10	O153:H25
O22:H8	O98: H <sup>-</sup>	O117:H4	O163:H19
O26:H11*, H <sup>-</sup>	O103:H2*	O118:H12, H16*	O165:H25, H <sup>-</sup>
O38:H21	O104:H2, H21	O119:H6	O168: H <sup>-</sup>
O45:H2*	O105:H18	O121:H19	O?:H2, H7, H19, H21
O46:H31			

S'han detectat més de cent cinquanta serotips productors de verotoxina, però no tots s'han associat a enteritis hemorràgica. Alguns dels que s'hi han associat amb més freqüència són els inclosos en aquesta taula.

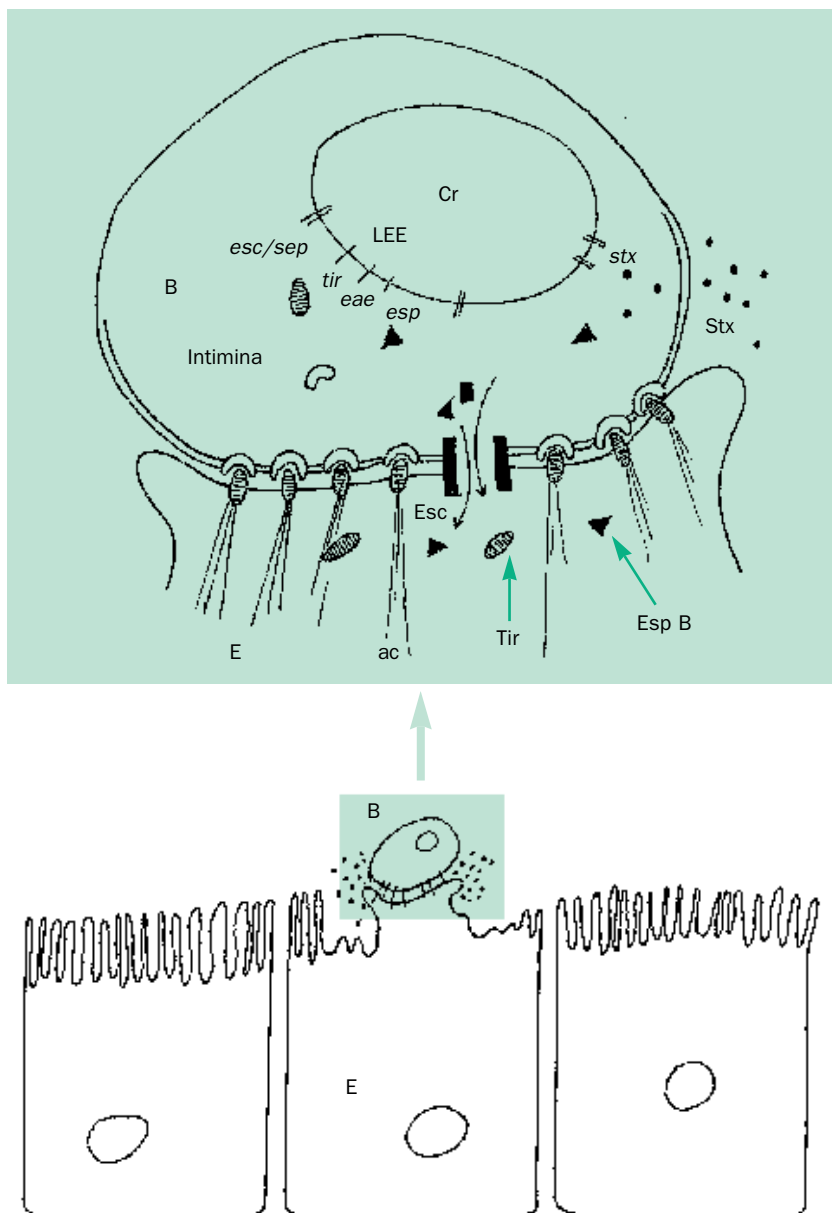
\*Serotips diferents de l'O157:H7 associats més sovint a la síndrome hemolíticourèmica en humans.

namentalment idèntic al d'*E. coli* enteropatògena clàssica. En aquest bacteri l'adherència compta amb una proteïna de la membrana externa, la intimina, codificada pel gen *eae* (86-88). La unió es produeix entre la intimina i unes proteïnes situades en la membrana externa dels enteròcits, anomenades Tir. Aquestes proteïnes Tir han estat sintetitzades pel bacteri i s'han injectat a l'interior de la cèl·lula intestinal (enteròcit) per un sistema específic i complex de secreció del bacteri, el sistema de tipus III (89, 90), i posteriorment s'han localitzat a la membrana de l'enteròcit, de manera que tant l'adhesina com el receptor han estat sintetitzats pel bacteri mateix. El gen *eae*, la proteïna Tir i les proteïnes que conformen el complex sistema de secreció-infecció de tipus III estan codificats en un fragment gènic del cromosoma bacterià anomenat LEE (*locus of enterocyte effacement*), perquè a la zona de contacte íntim entre el bacteri i la cèl·lula intestinal s'esborren les microvellositats d'aquesta última (procés d'*attaching and effacing*) a causa d'aquest tipus d'adherència específica (figura 3).

Molt probablement aquesta lesió d'esborrament de les microvellositats conseqüència de l'adherència és suficient perquè *E. coli* enteropatògena clàssica causi diarrea. La regulació del LEE a l'*E. coli* enteropatògena clàssica es fa des d'un plasmidi, però no a l'*E. coli* enterohemorràgica, de la qual es desconeix com es fa la regulació d'aquest complex gènic (91).

Aquests fragments gènics, com el LEE, formats per diversos gens de virulència, tenen marcadors que els assenyalen com a material genètic exogen; s'han anomenat "illes de patogenicitat" i són els que permeten la construcció de nous bacteris patògens.

**Figura 3. Mecanisme de producció de les lesions a l'enteròcit (esquemàtic)**



A la figura es representa la lesió d'esborrament de les microvellositats dels enteròcits i l'alliberament de verotoxina (Stx) per *E. coli* enterohemorràgica. El model de l'adherència s'ha pres d'*E. coli* enteropatògena clàssica que es presumeix idèntic al d'*E. coli* enterohemorràgica.

B: bacteri.

E: cèl·lula intestinal (enteròcit).

Cr: cromosoma bacterià.

LEE: *locus of enterocyte effacement*; el LEE és un fragment del cromosoma (illa de patogenicitat) amb diversos gens que codifiquen factors de virulència.

Intimina: adhesina que se situa a la membrana externa del bacteri.

Tir: proteïna que s'injecta a l'enteròcit mitjançant l'aparell de secreció de tipus III i que se situa a la superfície de l'enteròcit de manera que constitueix el receptor al qual s'uneix la intimina.

Esc: aparell de secreció de tipus III.

Esp: conjunt de proteïnes, algunes de les quals, com la B, són translocades a l'interior de l'enteròcit de manera que activen diversos sistemes de senyals que cooperen en l'alteració cel·lular. Els gens que regulen l'expressió del LEE en ECEPc estan situats en un plasmidi, però en ECEH es desconeix la seva localització.

ac: filaments d'actina. L'acció de la Tir sobre els filaments cel·lulars, probablement, fa que desapareguin les microvellositats (lesions d'*attaching and effacing*).

Stx: verotoxines. L'acció lesiva del procés d'*attaching and effacing* descrit, que és la que causa la diarrea en *E. coli* enteropatògena clàssica, en *E. coli* enterohemorràgica es veu agreujada per la producció de la toxina Stx, que actua per acció directa sobre l'enteròcit i sobre l'endoteli dels capil·lars intestinals, renals i d'altres localitzacions.

*esc/sep*: gens que codifiquen el sistema de secreció tipus III.

*tir*: gen que codifica la proteïna Tir.

*eae*: gen que codifica la intimina.

*esp*: gens que codifiquen les proteïnes Esp.

Tots aquests gens es localitzen a LEE.

*stx*: gen que codifica les verotoxines.

## Verotoxines

Konowalchuk *et al.* (14) en estudiar l'acció de la toxina termolàbil d'*E. coli* sobre diverses línies cel·lulars van detectar l'existència de un tipus diferent de toxina que produïa un intens efecte citopàtic sobre la línia cel·lular Vero (que és una línia de ronyó de mico verd africà). Aquesta toxina es va anomenar verotoxina (VT).

O'Brien *et al.*, (92) van purificar la verotoxina obtinguda d'*E. coli* i van trobar una semblança elevada amb l'estructura de la toxina de Shiga (Stx, de l'anglès *Shiga toxin*) produïda regularment per *Shigella dysenteriae* serotip 1. A més, la toxina d'*E. coli* podia ser neutralitzada per l'antitoxina anti-Stx, per la qual cosa es va anomenar *Shiga-like toxin*, SLT ('toxina semblant a la de Shiga'). Posteriorment s'ha pogut veure que hi ha dues classes de verotoxina (VT1 i VT2), i que alhora hi ha tres subtipus principals de VT2. L'any 1996 (93) es va proposar uniformar la nomenclatura d'aquestes toxines, de manera que avui és més emprat el nom de Stx1 i Stx2 que el de VT o el de SLT, que, en tot cas, són equivalents (taula 4).

Les Stx1 i Stx2 es troben codificades en bacteriòfags lamboides. Després d'infectar les soques d'*E. coli*, en comptes d'iniciar un cicle lític per repli-car-se, el genoma del bacteriòfag s'integra dins el cromosoma bacterià, en

el qual es multiplica sincrònicament (estat lisogènic). Les soques amb les dues toxines estan lisogenitzades per dos fags (94).

Sota certes condicions naturals o artificials, el bacteriòfag integrat en estat lisogènic s'indueix i passa a desenvolupar el cicle lític, de manera que comença la replicació lisant i sortint del bacteri, la qual cosa permet infectar —i integrar-se lisogènicament— altres bacteris de la mateixa espècie o d'altres espècies, com *Citrobacter freundii* o *Enterobacter cloacae*; així, els gens d'aquestes toxines es poden difondre entre diferents bacteris (95-97).

Les Stx estan formades per dues subunitats, A i B. La B és un pentàmer que s'uneix al receptor cel·lular de les cèl·lules eucariotes, que és un glibotriaisilceramida (Gb3). La subunitat A és la que penetra a l'interior del citoplasma cel·lular i exerceix l'acció tòxica.

Cadascú dels monòmers que constitueixen el pentàmer de la subunitat B de la toxina tenen una grandària de 7,7 kDa. La subunitat A és monomèrica i té una grandària de 32 kDa. S'escindeix per formar dos fragments: l'A<sub>1</sub> i l'A<sub>2</sub>. El fragment A<sub>2</sub> és el requerit per a la unió d'A a B; el fragment A<sub>1</sub> és el que exerceix l'acció tòxica.

La toxina unida pel fragment B a la membrana de la cèl·lula a través del Gb3 (98, 99) és endocitada a un vacúol fagocític i posteriorment es produeix el pas del fragment tòxic al citoplasma, per unir-se a la seva diana, que és un residu del fragment 28S de l'àcid ribonucleic ribosomal, la qual cosa comporta el bloqueig de la síntesi proteica i secundàriament la mort cel·lular. No es coneix amb precisió quan i com es produeix l'escissió del fragment A1 del conjunt de la toxina (100-105).

#### Taula 4. Nomenclatura proposada per a les verotoxines

Nom de les toxines	Sinònims	
	Gen	Proteïna
Toxina de Shiga ( <i>Shiga toxin</i> )	<i>stx</i>	Stx
Toxina <i>Shiga-like</i> I, (SLT-1), verotoxina 1, (VT1)	<i>stx<sub>1</sub></i>	Stx1
Toxina <i>Shiga-like</i> II, ( SLT-II), verotoxina 2, (VT2)	<i>stx<sub>2</sub></i>	Stx2
Toxina <i>Shiga-like</i> II <sub>c</sub> (SLT-II <sub>c</sub> ), verotoxina 2, (VT2 <sub>c</sub> )	<i>stx<sub>2c</sub></i>	Stx2 <sub>c</sub>
Toxina <i>Shiga-like</i> II <sub>d</sub> ( SLT-II <sub>d</sub> ), verotoxina 2, (VT2 <sub>d</sub> )	<i>stx<sub>2d</sub></i>	Stx2 <sub>d</sub>
Toxina <i>Shiga-like</i> II <sub>e</sub> (SLT-II <sub>e</sub> ), verotoxina 2, (VT2 <sub>e</sub> )	<i>stx<sub>2e</sub></i>	Stx2 <sub>e</sub>

Com s'ha assenyalat a la taula 4, hi ha diverses toxines de la família Stx. La Stx de *S. dysenteriae* 1 i la Stx 2e es troben codificades al cromosoma, però la Stx1 i la Stx2 i les variants 2c i 2d es troben codificades en bacteriòfags lamboides en estat lisogènic.

La Stx de *S. dysenteriae* serotip 1 i la Stx1 d'*E. coli* difereixen únicament en un aminoàcid de la subunitat A. Ambdues tenen identitat antigènica, de manera que l'antisèrum anti-Stx neutralitza l'acció de la Stx1.

Les toxines Stx2, Stx2c, Stx2d i Stx2e presenten diversos graus d'homologia de la seqüència aminoacídica amb la Stx1 i entre si. Les toxines del grup de la Stx2 no són neutralitzades pel sèrum anti-Stx, ni anti-Stx1, però l'antisèrum contra una de les Stx2 neutralitza les altres Stx2, encara que amb eficàcia variable (reacció encreuada) (taula 5).

En comparar les toxines, la variabilitat més notable és a la subunitat B, i això condiona l'afinitat d'adhesió a les cèl·lules; així, la Stx2e, que causa la malaltia edematosa del porc, s'uneix al globotriaosilceramida 4 (Gb4) (106, 107) en lloc d'al Gb3, al qual s'uneixen les altres.

L'acció tòxica sobre la línia Vero és semblant a totes les toxines, però l'acció letal sobre el ratolí per inoculació parenteral és diferent (taula 5). També s'ha detectat que la Stx2 és mil vegades més tòxica que la Stx1. La variant Stx2e que s'associa a la malaltia de l'edema del porc (108) excepcionalment causa patologia humana (109).

L'evidència de l'acció enteropatògena de les Stx es dedueix de diverses observacions. Només les soques productores de Stx causen la síndrome hemolíticourèmica. Efectivament, aquest procés patològic no és produït per les soques d'*E. coli* enteropatògena clàssica, que comparteixen amb les d'*E. coli* enterohemorràgica tots els factors de patogenicitat relatius a l'adherència però no la producció de Stx. Aquest fet també està corroborat perquè *S. dysenteriae* 1 és l'única shigel·la que produeix Stx i l'única que causa la síndrome hemolíticourèmica.

D'altra banda, la seva acció patògena s'ha demostrat en experiments en les nanses intestinals lligades (100, 110).

També s'han obtingut evidències addicionals d'experiments amb soques d'*E. coli* enteropatògena per al conill, causants d'enteritis benigna, semblant a la causada en l'home per *E. coli* enteropatògena clàssica, a les quals s'ha incorporat el gen de la Stx. Aleshores aquestes soques donen lloc a formes clíniques més greus (111, 112). A l'inrevés, en diversos experiments s'ha observat també que les soques d'*E. coli* enterohemorràgica amb Stx quan se suprimeix la producció de toxina ocasionen diarrea, però més benigna i no hemorràgica (113, 114). També s'ha demostrat *in vitro* l'extraordinària activitat tòxica d'aquestes toxines sobre les cèl·lules de l'endoteli vascular, que produeixen lesions que són característiques de la síndrome hemolíticourèmica.

S'accepta que la Stx produïda per l'*E. coli* al budell pot passar a la sang, (115, 116). La inoculació de Stx1 o Stx2 al conill causa lesions vasculars (117), però no produeix lesió renal, encara que en l'home s'observa infla-

mació de les cèl·lules endotelials del glomèrul renal i dipòsits de plaquetes i fibrina, lesions que serien la causa de la insuficiència renal aguda en la síndrome hemolíticourèmica. El pas dels hematies per la microcirculació capil·lar ocluída els lesionaria i es produirien els eritròcits fragmentats característics.

S'ha suggerit que la Stx2 és més important que la Stx1 en el desenvolupament de la síndrome hemolíticourèmica (115), de manera que les soques productores de Stx2 causen més sovint síndrome hemolíticourèmica que les que produeixen Stx1 (o fins i tot, paradoxalment, que les productores de Stx1 i Stx2 simultàniament) (118-120). Encara que hi ha dades contradictòries respecte a aquest punt, cal tenir present que la Stx2 té diverses variants (taula 5), i per tant cadascuna pot tenir diferent efecte final (121, 122).

**Taula 5. Comparació entre Stx1 i Stx2 i els seus subgrups**

Tipus de Stx	Homologia d'aminoàcids amb la Stx2 (%)		Activitat específica per a Vero <sup>1</sup>	DL <sub>50</sub> (ng) de les toxines <sup>2</sup> (ratolí)	Activació pel mucus intestinal	DL <sub>50</sub> d' <i>E. coli</i> verotoxigena <sup>3</sup>
	A	B				
1	55	57	1 x 10 <sup>9</sup>	400	No	No virulent
2	100	100	(0,75-5) x 10 <sup>9</sup>	0,5-2	No	~10 <sup>10</sup>
2c	100	97	n.d.	n.d.	No	~10 <sup>10</sup>
2d	99	97	5 x 10 <sup>7</sup>	1-5	Si	<10
2e	93	84	2 x 10 <sup>9</sup>	200	No	No virulent

1. Cèl·lules Vero/mg de proteïna.

2. DL<sub>50</sub> de cadascuna de les toxines injectades intraperitonealment al ratolí.

3. DL<sub>50</sub> de les soques productores de cadascuna de les toxines al ratolí CD-1 tractat amb estreptomicina.

n.d.: no determinat.

Font: Kaper (32), modificada.

S'han assenyalat mecanismes complementaris que intervenen en la producció de la síndrome hemolíticourèmica, a part de l'acció directa de les Stx a l'endoteli, com ara la participació de diverses citoquines com l'IL-8, l'IL-1, l'IL-6 i el TNF- $\alpha$ , induïdes pel procés inflamatori inicial i la mateixa toxina (123-126). Un dels mecanismes involucrats podria ser la sobreexpressió de receptors Gb3 per a les Stx. La importància relativa de l'acció de les citoquines en relació amb la toxina no es coneix amb precisió.

### Altres factors de virulència

Pràcticament totes les soques d'*E. coli* O157:H7 són portadores d'un plasmidi de grans dimensions (entre 93,6 i 104 kb) (127, 128) anomenat

pO157. Aquest plasmidi porta diversos gens, la relació dels quals amb la patogenicitat no és coneguda. D'entre aquests gens es pot destacar el que codifica l'enterohemolisina i el que codifica la proteïna Esp P, que és una serinaproteasa. Aquest gens *ehsA* i *espP* s'han trobat en el 100 % de soques d'*E. coli* enterohemorràgica del serotip O157:H7 i en el 95 % i el 36 % respectivament de les soques enterohemorràgiques de serotips diferents de l'O157:H7 (129, 130).

No es coneix la importància de l'enterohemolisina, que és diferent de la clàssica hemolisina alfa de les soques d'*E. coli* uropatògena, però, com aquesta, podria tenir una funció de leucotoxina (131).

Les serinaproteases han estat considerades factors de patogenicitat en alguns bacteris. Entre les seves accions hi ha l'activitat sobre el factor V de la coagulació, que pot afavorir el sagnat. Així doncs, encara que les lesions de la mucosa intestinal en les enteritis per *E. coli* enterohemorràgica estan causades fonamentalment per les Stx, l'EspP podria afavorir el procés.

Algunes soques productores de Stx del serotip O157:H7 i d'altres presenten el gen *ast A* que codifica l'EAST1, una toxina termoestable diferent de la toxina ST d'*E. coli* enterotoxígena (132). No es coneix la participació d'aquesta proteïna en la patogenicitat de les soques d'*E. coli* enterohemorràgica.

Finalment, *E. coli* O157:H7 s'ha mostrat més resistent als àcids que altres soques d'*E. coli*. Aquest fet podria explicar la baixa dosi infectant en l'home, així com la persistència al tub digestiu dels remugadors en determinades circumstàncies (com es pot veure més endavant) i la posterior persistència en els aliments àcids (133). L'activació del gen *rpoS* i la producció del factor sigma en fase estacionària constitueixen mecanismes addicionals de la supervivència a pH baix (134), i les mutacions en aquests gens podrien justificar diferències en la infectivitat de diferents soques verotoxigenes d'*E. coli* (13).

### **Evolució d'*E. coli* O157:H7**

Els estudis d'isoenzims mitjançant tècniques electroforètiques demostren que *E. coli* O157:H7 constitueix un grup homogeni, clonal, allunyat d'altres *E. coli* verotoxigenes, fins i tot d'altres soques enterohemorràgiques com l'O111:H<sup>-</sup> o l'O26:H11. El clon O157:H7 està relacionat amb un serotip (clon) d'*E. coli* enteropatògena clàssica, l'O55:H7, que no produeix Stx (135, 136).

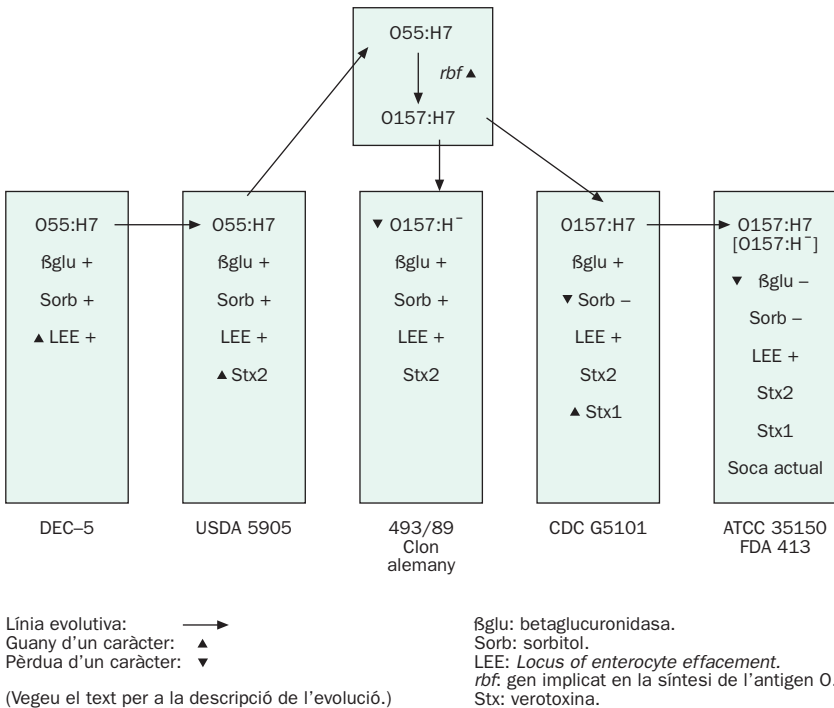
L'evolució podria haver seguit la seqüència següent: l'actual *E. coli* enterohemorràgica O157:H7 s'hauria originat a partir d'una soca d'*E. coli* O55:H7 que expressava l'enzim  $\beta$ -glucuronidasa ( $\beta$ glu +), atacava el sorbitol (sorb +) i posseïa el LEE amb el gen *eae*; aquest bacteri ancestral seria semblant a l'actual *E. coli* enteropatògena clàssica, l'O55:H7 (137, 138).

El pas següent hauria estat l'adquisició de la Stx2 per transducció d'un bacteriòfag, per la qual cosa, aleshores, la soca O55:H7 produiria Stx2. Posteriorment s'hauria donat el canvi de l'antigen O55 per l'O157 per un procés de recombinació amb el gen *rfbE* (139) i el guany del plasmidi de 90 kb (140). No s'ha detectat cap soca amb aquestes característiques.

El següent pas a partir de la hipotètica soca no detectada va seguir una doble línia evolutiva: una que perdia el flagel H (O157:H<sup>-</sup>, Stx2+, βglu+, sorb+), que seria l'actual "clon alemany" (141, 142), i l'altra que guanyava la Stx1 i perdia la capacitat d'atacar el sorbitol. Aquesta, finalment, també perd l'activitat β-glucuronidasa i dona lloc a la soca típica que ha difós universalment (143).

A la figura 4 es representa aquesta evolució i s'indiquen les soques de diferents col·leccions que representen els diversos estadis evolutius.

**Figura 4. Evolució d'*Escherichia coli* O157:H7**





### 2.3.2 Resistència als agents físics i químics

Una propietat important dels microorganismes patògens associats a la transmissió fecal-oral és la seva resistència tant als agents físics com als químics. La supervivència i multiplicació d'aquests microorganismes als aliments depèn de factors com el pH, l'activitat de l'aigua, la humitat relativa, el potencial redox, la temperatura de conservació i els tractaments específics per a la seva conservació.

Si bé *E. coli* O157:H7 és similar en molts aspectes a la resta de soques d'*E. coli*, s'ha observat que presenta una capacitat inusual per sobreviure en entorns poc favorables i en condicions d'estrès. Estudis de recerca i la investigació de brots produïts per aliments contaminats per aquest bacteri han permès revelar que *E. coli* O157:H7 pot sobreviure i multiplicar-se en una gran varietat d'aliments, fins i tot en aliments considerats segurs per a la majoria dels microorganismes patògens vehiculats per aliments.

#### Temperatura

Estudis realitzats per determinar el gradient de temperatures on es pot multiplicar *E. coli* O157:H7 indiquen que la majoria de les soques poden créixer entre 10 °C i 45 °C, encara que s'ha observat que en aquestes temperatures extremes el seu creixement és molt lent i depèn del medi o el substrat utilitzat (144).

A l'aigua, *E. coli* O157:H7 pot sobreviure diverses setmanes (aproximadament 90 dies), especialment si la temperatura és baixa. Així, en un estudi realitzat per Wang i Doyle (145) observen que *E. coli* O157:H7 sobreviu bé a 8 °C durant tretze setmanes, a 15 °C es pot detectar durant set setmanes, i a partir de les vuit setmanes la seva concentració disminueix fins a límits no detectables. A 25 °C *E. coli* O157:H7 es pot detectar fins a sis setmanes, tot i que el grau de supervivència depèn de cada soca i de la composició de l'aigua.

El microorganisme pot sobreviure a temperatures de -20 °C i -80 °C, fonamentalment en aliments carnis; és a dir, es pot mantenir als aliments congelats sense canvis en la seva viabilitat durant períodes llargs de temps, fins i tot més de nou mesos (146).

D'altra banda, aquest microorganisme és poc resistent a temperatures altes amb valors D (temps necessari per destruir el 90 % de la població) de 270, 45, 24 i 9,6 segons a temperatures de 57,2 °C, 60 °C, 62,8 °C i 64,5 °C, respectivament (146). *E. coli* O157:H7 presenta una resistència a la calor menor o molt semblant a la majoria dels serotips de *Salmonella*. Aquest fet fa que es recomani que per als aliments d'origen animal la temperatura interna durant la cocció sigui de 68,5 °C.

La seva resistència a la calor es pot incrementar per diferents factors. S'ha observat que aquest bacteri és més resistent a la calor en empanades

congelades que en les conservades a 15 °C. També s'ha demostrat que la presència de greix en els aliments carnis pot incrementar la seva resistència a la calor. Així, amb un 2 % de greix els valors D són de 246 segons a 57,2 °C i de 18 segons a 62,8 °C, mentre que amb un 30,5 % de greixos els valors D són de 318 segons a 57,2 °C i de 30 segons a 62,8 °C.

Temperatures de pasteurització de 72 °C durant 16,2 segons a la llet garanteixen l'eliminació de 10<sup>4</sup> cèl·lules d'*E. coli* O157:H7 per mL (147).

## pH

Una característica important d'*E. coli* O157:H7 és la seva tolerància a sobreviure en medis àcids. Aquesta propietat de tolerància als àcids facilita que sobrevisqui en aliments en què les condicions àcides inactiven la majoria dels microorganismes patògens, i al mateix temps pot reduir la dosi infectiva quan el vehicle d'infecció és un aliment lleugerament àcid.

S'ha demostrat que *E. coli* enterohemorràgica pot conservar la seva viabilitat en un pH inferior a 2,5 durant dues hores, i que en condicions de laboratori pot sobreviure en fase estacionària a un pH d'1,5 durant una hora. En fase estacionària *E. coli* O157:H7 és més resistent a l'àcid que no pas en creixement exponencial, i a més no necessita una exposició prèvia a un pH baix per adaptar-se a medis àcids (146).

Diversos estudis de la tolerància als àcids d'*E. coli* O157:H7 en aliments assenyalen que aquest bacteri pot sobreviure en aliments i begudes fermentades amb un pH de 4,5 durant més de dos mesos a 4 °C, de manera que la seva població es redueix només cent vegades (148). Així, en el suc de poma o sidra amb un pH de 3,6 a 4, pot sobreviure durant 10-30 dies a 8 °C i durant 2 o 3 dies a 25 °C. Al iogurt *E. coli* O157:H7 manté la seva viabilitat després del procés de fermentació a 42 °C durant cinc hores i una conservació a 4 °C durant una setmana. La concentració del bacteri disminueix només de deu a cent vegades quan el pH final del iogurt és de 4,4.

La utilització d'àcids orgànics com l'àcid acètic, l'àcid cítric i l'àcid làctic com a desinfectants superficials de la carn (esprais) a concentracions superiors a 1,5 % han demostrat que *E. coli* O157:H7 no es veu afectat per aquests tractaments; és a dir, la seva concentració no disminueix o bé es produeix una disminució poc important. D'altra banda, l'associació d'aquest tractament amb la calor (temperatures de 50 °C) tampoc no augmenta l'eficàcia de descontaminació a la carn (149).

També s'ha observat que quan s'inoculen altes concentracions d'aquest microorganisme en maioneses amb un pH de 3,6 a 3,9 es pot mantenir durant un període de cinc a set setmanes a 5 °C i entre una i tres setmanes a 20 °C (150). Abdul-Raouf *et al.* (151) en un estudi observaren que en maioneses acidificades amb àcid acètic, cítric i làctic (pH de 4,7) la població d'*E. coli* O157:H7 es manté constant durant 24 hores a 5 °C i 20 °C, mentre que a

30 °C a les 24 hores la seva concentració augmenta i aquest increment és més significatiu amb els àcids cítric i làctic que no pas amb l'acètic.

El mecanisme de tolerància d'*E. coli* O157:H7 per sobreviure en medis àcids s'ha associat a tres sistemes proteics de resistència que inclouen un sistema oxidatiu, un sistema argininodependent i un sistema glutamatodependent. El gen *rpoS* seria l'encarregat d'activar el sistema oxidatiu, mentre que activaria parcialment els sistemes argininodependent i glutamatodependent. Aquests sistemes contribueixen a la supervivència del bacteri en diferents medis àcids (pH de 2 a 6,5) i es poden mantenir actius durant llargs períodes de temps a temperatures de 4 °C (134, 146, 152).

### **Resistència als desinfectants**

La resistència als tractaments amb diferents desinfectants s'ha estudiat a fi de determinar l'efectivitat per reduir aquest bacteri en els vegetals i altres productes.

Diversos estudis revelen que l'efectivitat dels desinfectants depèn del tipus i la dosi, la concentració de microorganismes i el temps d'exposició del desinfectant. Així, la utilització de peròxid d'hidrogen, ozó, diòxid de clor i altres combinats de peròxid d'hidrogen amb altres agents a concentracions estàndard han demostrat que poden reduir la població d'*E. coli* enterohemorràgica fins a 5-log (153, 154).

Contràriament, altres estudis indiquen que *E. coli* O157:H7 pot desenvolupar resistències al clor a concentracions superiors a 0,5 mg/L, que serien les concentracions recomanades en el tractament d'aigües potables (155).

### **Resistència a antimicrobians**

*E. coli* O157:H7 és sensible a la majoria dels antibiòtics, tot i que els últims anys s'ha observat un increment de resistència fonamentalment a l'estreptomicina, les sulfamides i la tetraciclina. Per exemple, en un estudi de 125 soques d'*E. coli* O157 aïllades en humans, aliments i animals, el 24 % de les soques eren resistents a un antibiòtic, i el 19 % eren resistents a tres o més antibiòtics. L'estreptomicina i la tetraciclina van ser els antibiòtics que presentaven més resistències (156).

### **Altres factors**

El tractament amb irradiacions s'ha proposat com a tractament alternatiu per eliminar *E. coli* O157:H7 en els aliments. S'ha demostrat que les radiacions gamma a dosis de 1,5 a 3 jGy són efectives per eliminar *E. coli* enterohemorràgica en els productes carnis i d'altres com la sidra o el suc de poma, sempre que el producte es mantingui a temperatures de refrigeració.

També s'ha observat que *E. coli* O157:H7 és extremadament sensible a les irradiacions amb raigs ultravioletes: dosis de 12 J/m<sup>2</sup> són suficients per reduir 6-log la població d'*E. coli* enterohemorràgica (146, 157).

Així com altres enteropatògens poden sobreviure i créixer en presència de sal, *E. coli* O157:H7 no presenta una tolerància inusual al clorur sòdic. Al laboratori s'ha demostrat que només pot créixer en medis líquids que contenen concentracions de NaCl inferiors al 6,5 %.

Tanmateix, *E. coli* O157:H7 és un microorganisme poc resistent a la dessecació; s'ha observat que en derivats carnis dessecats durant deu hores a 60 °C aquest bacteri no es pot recuperar, i amb tractaments de sis a vuit hores a 62 °C només es recupera després de l'enriquiment (146).

## 2.4 Altres serotips d'*E. coli* verotoxigena

*Escherichia coli* O157:H7 és el serotip d'*E. coli* enterohemorràgica que més sovint causa enteritis hemorràgica en l'ésser humà. No obstant això, altres serotips d'*E. coli* productors de verotoxines també han estat implicats tant en casos esporàdics com en brots de toxiinfeccions alimentàries, i han donat lloc a manifestacions clíniques que, com les causades per *E. coli* O157:H7, van des d'una diarrea autolimitada o una colitis hemorràgica fins a complicacions greus com són la síndrome hemolíticourèmica i la púrpura trombòtica trombocitopènica i, per tant, s'inclouen en el grup d'*E. coli* enterohemorràgica.

La incidència de les soques d'*E. coli* enterohemorràgica no O157:H7 no és coneix, encara que es considera que pot ser relativament elevada. El descobriment de la vertadera incidència d'aquestes soques no O157:H7 és de güt, fonamentalment, a la dificultat que implica detectar-lo, ja que a diferència de les soques d'O157:H7 no presenten característiques fenotípiques diferencials com el caràcter sorbitol i  $\beta$ -glucuronidasa negatius, que permetin identificar-los en els medis de cultiu selectius específics. A més, pràcticament totes les soques del serotip O157:H7 són productores de VT i tenen capacitat patogènica, per la qual cosa en termes pràctics quan s'identifica aquest serotip no cal estudiar la producció de VT (vegeu l'apartat 5). Contràriament, per detectar les altres soques verotoxigenes que pertanyen a molts serotips diferents per als quals no es disposa de marcadors que permetin identificar les seves colònies, i dintre dels quals no totes les soques produeixen verotoxina, és necessària la demostració directa de la producció de la verotoxina o dels seus gens.

En l'actualitat es coneixen més de cent cinquanta serotips d'*E. coli* productors de verotoxines (34,67) aïllats en l'ésser humà, en animals i en aliments, encara que no tots s'han associat a enteritis i, per tant, no tots es consideren enterohemorràgics.

*E. coli* O26:H11 va ser el primer serotip verotoxigènica no O157:H7 classificat com *E. coli* enterohemorràgica. Posteriorment s'han descrit més de cinquanta serotips d'*E. coli* associats amb colitis hemorràgica i síndrome

hemoliticourèmica en l'èsser humà, alguns dels quals han causat brots a diferents països (81, 158-163) (taula 3). Probablement, en un futur aquesta taula anirà recollint nous serotips d'*E. coli* amb capacitat per produir colitis hemorràgica i síndrome hemoliticourèmica.

Els serotips d'*E. coli* enterohemorràgica no O157:H7 associats a la síndrome hemoliticourèmica més comuns són O26: H11, O103:H2, O111:H<sup>-</sup>, O113:H21 i O145:H<sup>-</sup> (30, 164). Aquests i altres serotips com O4:H<sup>-</sup>, O45:H2, O50:H7, O111:H8, O121:H19 i O125:H<sup>-</sup> també s'han relacionat amb casos de diarrees de gravetat variable (taula 3).

En un estudi prospectiu a Canadà, es va observar que el 2,1 % de les mostres de femta estudiades eren positives per a *E. coli* verotoxígena, i que d'aquestes el 58 % eren *E. coli* no O157:H7 (165). A Bèlgica entre 1990 i 1993 es van detectar soques verotoxígenes en un 1 % de les femtes estudiades, de les quals el 76 % eren *E. coli* no O157:H7 corresponents a més de 35 serotips diferents (166).

Les infeccions humanes per aquestes *E. coli* enterohemorràgiques s'han descrit tant en casos esporàdics com en brots epidèmics més o menys grans produïts pel consum d'aliments o aigües contaminades. Aquest es el cas dels brots produïts a Itàlia el 1992 per *E. coli* O111:H<sup>-</sup>, que va afectar nou nens amb la síndrome hemoliticourèmica (167); a Austràlia, on *E. coli* O111:H<sup>-</sup> va afectar cent persones, de les quals 23 van desenvolupar la síndrome hemoliticourèmica (168); als Estats Units, on *E. coli* O104:H21 va infectar onze persones (169), i a Txecoslovàquia, on el serotip O26:H11 es va aïllar en cinc nens amb síndrome hemoliticourèmica (170).

Estudis epidemiològics han confirmat que el bestiar i altres animals excreten freqüentment *E. coli* verotoxígenes amb la femta. Es coneix que la incidència d'*E. coli* verotoxígena és del 3 % al 27 % en el bestiar amb diarrea i d'un 7 % a un 32 % en animals sans. Predominen el serotips O116:H21, O22:H8, O156:NM, O26:H11, O?:H21, O113:H21, O153:H25 i O103:H2.

En el porc els serotips O138:H14, O139:H1 i O141:H4 causen la malaltia edematosa del porc a través de la toxina Stx2e. Aquestes soques no produeixen les lesions d'*attaching and effacing*, i l'adherència es deu probablement a una adhesina fimbriada (164, 171, 172).

És probable, doncs, que aquests animals siguin el reservori natural, i que per tant els aliments carnis, fonamentalment els d'origen boví, siguin la font principal de transmissió per a l'èsser humà. Altres aliments com la llet, els vegetals i la sidra de poma també s'han descrit com a fonts de transmissió per a les persones.

La baixa incidència relativa en les nostres àrees de soques d'*E. coli* no O157:H7 relacionades amb infecció humana, i l'elevada freqüència amb què

s'aïllen aquestes soques d'*E. coli* verotoxígena formant part de la flora intestinal en el bestiar (reservori) han suggerit que la producció de verotoxines no és suficient per causar malaltia en l'ésser humà.

Dos factors que potencialment poden contribuir a la patogenicitat de les *E. coli* no O157:H7 reconegudes com a enterohemorràgiques són el gen *eae* i el plàsmid de 90 kb. El gen *eae*, localitzat al cromosoma, codifica la capacitat d'adherència del bacteri a l'enteròcit i la destrucció posterior de les microvellositats de l'enteròcit (lesions *attaching and effacing*) (164, 173). L'adherència en alguns casos de soques patògenes mancades d'*eae* podria estar produïda per fimbries (174). Aquests factors de virulència ja han estat assenyalats (vegeu l'apartat 2.3.1) (163, 175).

Diferents autors han estudiat la distribució del gen *eae* i del plasmidi de 90 kb en soques aïllades en animals i humans, i encara que els resultats obtinguts són molt variats, la majoria coincideixen en el fet que no totes les soques d'*E. coli* no O157:H7 tenen el mateix poder de virulència. D'altra banda, s'ha observat que les soques portadores del gen *eae* i el plasmidi de 90 kb s'aïllen amb més freqüència en humans simptomàtics que en animals o aliments. Així, en un estudi de 208 soques d'*E. coli* verotoxígenes no O157:H7 aïllades en set espècies d'animals diferents, només l'1,4 % de les soques eren portadores dels gen *eae* (176). Un altre estudi demostra que el 84 % de les soques d'*E. coli* verotoxígenes no O157:H7 aïllades en humans eren portadores del gen *eae* i del plasmidi de 90kb, mentre que només el 46 % de les aïllades en bòvids eren portadores d'aquests factors de virulència (177). Recentment, un estudi multivariant mostrava que el serotip i la presència dels gens *stx<sub>2</sub>* i *eae* (intimina) s'associaven a la producció de malaltia, però no el de l'hemolisina *ehxA* (178a).

De tota manera, el fet que soques d'*E. coli* no O157:H7 verotoxígenes que no són portadores del gen *eae* i/o el plasmidi de 90 kb hagin estat associades a brots epidèmics o casos esporàdics en què es produïa la malaltia en l'home (O48:H21, O104:H21 i O113:H21) (162), indica que aquest factors de virulència per si sols no permeten la diferenciació entre les soques patogèniques i les no patogèniques d'*E. coli* no O157:H7 verotoxígenes, i fa pensar que podrien existir altres factors que encara no es coneixen.

La detecció d'*E. coli* enterohemorràgica no O157:H7, com ja s'ha comentat, requereix la demostració de la capacitat de les soques per produir verotoxines o bé la detecció dels seus gens, fonamentalment a causa del gran nombre de serotips productors de VT i a la inexistència de característiques fenotípiques diferencials que permetin la seva identificació presumptiva en un medi de cultiu selectiu específic. La detecció de les verotoxines es pot realitzar mitjançant assaigs biològics, com la demostració de l'efecte citotòxic produït a la línia cel·lular Vero, per mètodes immunològics

(ELISA) o bé per tècniques moleculars com la PCR, que permet detectar els gens de les verotoxines. (Per al diagnòstic de les infeccions per aquests microorganismes vegeu l'apartat 5.)

El serotipat de la soca i la detecció del factor de virulència *eae* i el plasmidi de 90 kb mitjançant tècniques de PCR poden contribuir a confirmar la patogenicitat de les soques.

Els estudis infraespecífics d'aquestes soques d'*E. coli* amb propòsits epidemiològics no acostumen a ser necessaris en àrees on el serotip detectat és molt infreqüent, ja que l'aïllament del mateix serotip en un brot a la pràctica és una demostració suficient de la identitat de la soca.

Això no treu que s'hagin utilitzat les diferents tècniques descrites més amunt com el biotipat o la PFGE. D'altra banda, el joc de fags utilitzats per a lisotipar l'O157:H7 ha estat utilitzat també per a aquests serotips.

### 3. Epidemiologia de les infeccions per *E. coli* verotoxígena

#### 3.1 Epidemiologia descriptiva en humans

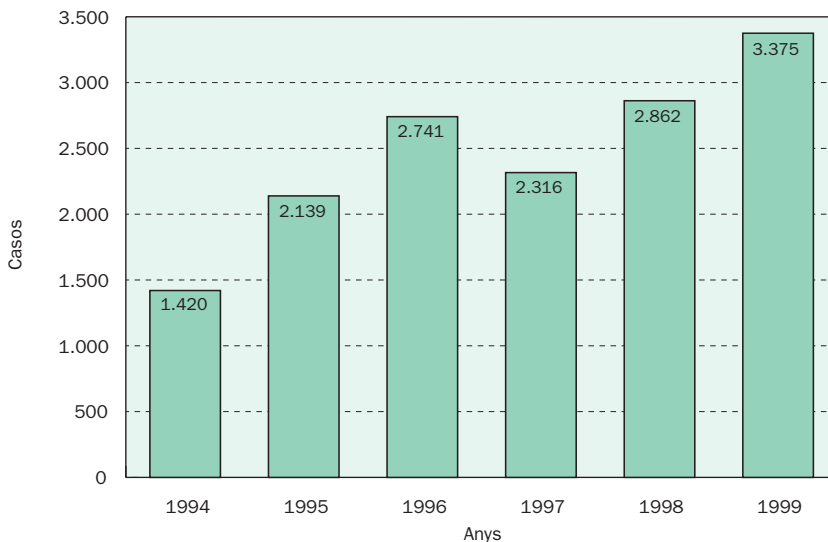
##### 3.1.1 Incidència de la malaltia

D'ençà que es va identificar l'any 1982 el primer brot de gastroenteritis per *E. coli* O157:H7, les dades disponibles sobre la incidència de la malaltia són irregulars i estan limitades a pocs països.

Als Estats Units, fins a mitjan 1993 la infecció per *E. coli* O157:H7 només era de declaració obligatòria en alguns estats; el juny de 1993 es va establir de declaració obligatòria tot el país (178b). A partir de l'any 1994 el nombre de casos notificats ha oscil·lat entre 1.420 l'any 1994 i 3.375 l'any 1999. A la figura 5 se'n pot observar l'evolució.

A Canadà, la infecció per *E. coli* verotoxígena es va fer de declaració obligatòria a partir de l'any 1990, i les taxes d'incidència per 100.000 persones/any han oscil·lat entre 4 per 100.000 l'any 1993 i 6,1 l'any 1992 (figura 6).

**Figura 5. Evolució dels casos d'infecció per *E. coli* O157:H7 als Estats Units (1994-1999)**



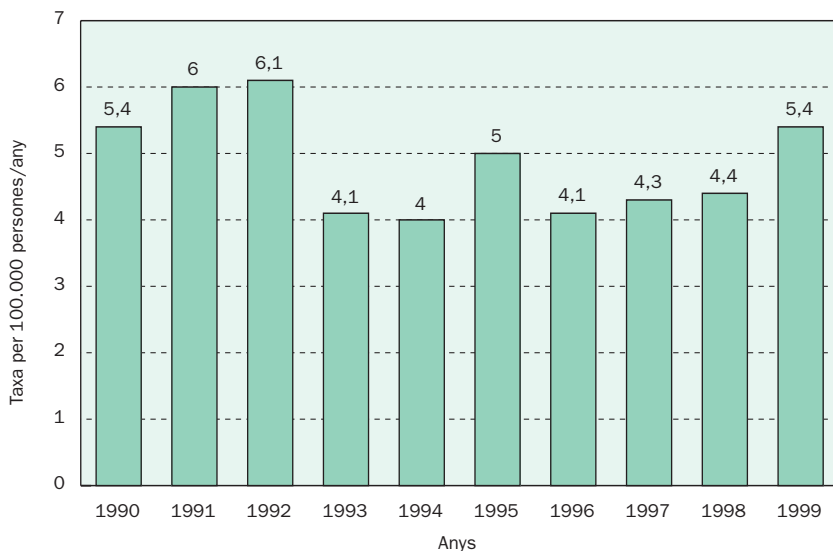
Font: *Morbidity and Mortality Weekly Report*, diversos números.



Tanmateix, aquestes xifres de morbiditat declarada probablement infravaloren el problema. Alguns autors (179) consideren que si es tingués en compte el nombre de casos que no van als serveis mèdics, els que no es diagnostiquen i els que no es declaren, el nombre estimat de casos anuals al Canadà seria de 12.950 (l'any 1999 es declaren 1.603 casos), i als Estats Units de 62.450 (davant dels 3.375 casos declarats l'any 1999).

A Espanya, les observacions fetes per grups que han investigat sobre el tema (79, 180-183) suggereixen que la incidència en humans ha estat molt baixa. El setembre de l'any 2000 es va produir un brot de toxiinfecció alimentària a la província de Barcelona amb 181 afectats (sis casos amb la síndrome hemolíticourèmica) causat per *E. coli* O157:H7 productor de Stx2 del fagotip 2. Fins aleshores els casos que s'havien presentat a Espanya o no estaven relacionats amb altres casos (eren esporàdics) o formaven part de petits brots, com el de Canàries del 1997 que va afectar turistes europeus de diversos països (taula 6) (184). A Catalunya, des de 1986 fins a 2000 s'havien detectat poc més de vint casos esporàdics. Les dades estatals del Laboratori Nacional de Referència d'Enterobacteris també van en aquest sentit, ja que des de l'any 1996 fins al 1999 només s'ha identificat dotze soques d'*E. coli* O157:H7 (a la taula 7 se'n pot observar la distribució per anys i comunitats autònomes).

**Figura 6. Taxes d'incidència d'infecció per *E. coli* verotoxigena a Canadà**



Font: *Canada Communicable Disease Report*, diversos números.

**Taula 6. Brots causats per *Escherichia coli* verotoxígena O157:H7 a Espanya**

Loc	Any	Afectats. Situació	Serotips		Nombre d'afectats
			Verotoxines	Fagotips	
Eivissa (Illes Balears)	1986	Turistes britànics en un hotel	O157:H7	VT2	3 (+ 3 asimptomàtics)
Illes Balears	1994	Turistes britànics	O157:H7	VT2 Fagotip 2	
Àlaba (País Basc)	1995	Nois en una casa de camp	O111:H-	VT1	13
Fuerteventura (Illes Canàries)	1997	Turistes europeus en quatre hotels	O157:H7	VT2 Fagotip 2	14 (3 amb SHU)
Guipúscoa (País Basc)	1999	Nens en una guarderia	O157:H7		8 (1 amb SHU) (+ 6 asimptomàtics)
Guipúscoa (País Basc)	1999		O157:H7		2 (1 amb SHU) (+ 2 asimptomàtics)

SHU: síndrome hemoliticourèmica.

Font: J. Blanco. <http://secuslugo.lugo.usc.es/ecoli/BROTES.html>

**Taula 7. Soques d'*Escherichia coli* O157:H7 identificades al Laboratori Nacional de Referència d'Enterobacteris. Espanya, 1996-1999**

Comunitat autònoma	1996	1997	1998	1999	Total
Astúries (Oviedo)			1		1
Canàries (Las Palmas de Gran Canaria)		1			1
Castella i Lleó (Burgos)			1		1
Catalunya (Barcelona)			1		1
Madrid (Madrid)	4		2	1	7
País Valencià (València)				1	1
<b>Total</b>	<b>4</b>	<b>1</b>	<b>5</b>	<b>2</b>	<b>12</b>

Font: Informe "Enter-net: Red Europea de Vigilancia de Enfermedades Entéricas, *Salmonella* y *Escherichia coli*". Centre Nacional d'Epidemiologia, 2000.

### 3.1.2 Epidemiologia dels casos esporàdics

Un primer estudi prospectiu realitzat durant el període 1985-1986 als Estats Units (185) en pacients atesos per una organització de manteniment de la salut va mostrar que de 6.485 mostres de femta analitzades, l'agent més freqüent va ser *Campylobacter* (3,6 %), seguit de *Salmonella* (1,5 %), *E. coli* O157:H7 (0,6 %) i *Shigella* (0,5 %). L'antecedent de consum de carn de boví poc feta durant la setmana prèvia a l'inici dels símptomes es va trobar més sovint en els infectats per *E. coli* O157:H7 que en els infectats per altres agents, encara que les diferències no van ser significatives.

En un estudi multicèntric prospectiu realitzat entre 1990 i 1992 als Estats Units (186), en el qual es van estudiar 30.463 mostres fecals pertanyents a pacients que havien estat hospitalitzats o tractats ambulatoriament per a la identificació de patògens, en 1.708 mostres (5,6 %) es va aïllar almenys un patògen, i en onze mostres es va aïllar una infecció mixta. Globalment l'agent més freqüent va ser *Campylobacter* (2,3 %), seguit per *Salmonella* (1,8 %) i *Shigella* (1,1 %). *E. coli* O157:H7 es va trobar en 118 mostres (0,4 %), i la majoria d'aquests aïllaments es va obtenir de nens de cinc a nou anys i d'adults de 50 a 59 anys. En les persones de menys de 50 anys, *E. coli* O157:H7 va ser el patògen menys freqüent. Per sobre dels 50 anys *E. coli* O157:H7 es va trobar més sovint que *Shigella* (0,36 % vs 0,24 %). Encara que *Campylobacter*, *Salmonella*, *Shigella* i *E. coli* O157:H7 es van aïllar en proporcions variables a les femtes amb sang, aquest últim microorganisme es va aïllar amb una freqüència superior als altres (7,8 % de les mostres hemàtiques). El quadre clínic avaluat per a la indicació d'ingrés en hospital també era més greu en les infeccions per aquest microorganisme que en les dels altres indicats (187). L'estudi també va mostrar l'existència de diferències geogràfiques pel que fa a l'aïllament d'*E. coli* O157:H7, que era més freqüent al nord del país, a prop de Canadà, que al sud.

La incidència d'*E. coli* enterohemorràgica d'altres serotips diferents de l'O157:H7 és difícil de conèixer (vegeu l'apartat 5). En dos estudis petits, amb menys de mil mostres, realitzats als Estats Units el 1991 (188, 189), la relació entre soques d'*E. coli* O157 versus *E. coli* no O157 va ser d'1,8 vs 1 i 2 vs 1, respectivament. En un altre estudi realitzat entre 1995 i 1996 a Minnesota, sobre 3.500 mostres estudiades per PCR per al gen *stx*, la relació va ser 1,5:1, en el qual el serotip O26:H11 era el més freqüent entre els serotips no O157 (190).

Tanmateix, la freqüència amb què es troba *E. coli* O157:H7 a diferents països és molt variable. A Alemanya són més freqüents els aïllaments de soques d'*E. coli* enterohemorràgica d'altres serotips diferents a l'O157 en relacions de 0,4 vs 1 (141) i 0,2 vs 1 (161).

A Canadà també s'han detectat variacions en la taxa de incidència entre diverses províncies, amb un màxim a l'Illa del Príncep Eduard, amb 10,2 casos per 100.000, i un mínim de 2,5 al nord del país; la mitjana del país se situa al voltant de 4,5 casos per 100.000. La major incidència s'observa a les àrees rurals (191, 192).

Dels estudis de casos esporàdics (193-195) s'ha comprovat que la infecció per *E. coli* enterohemorràgica està associada a dinars a l'aire lliure, menjar carn poc cuita i menjar carn que manté el color rosat; mentre que no va resultar un factor de risc menjar carn picada si era ben cuita.

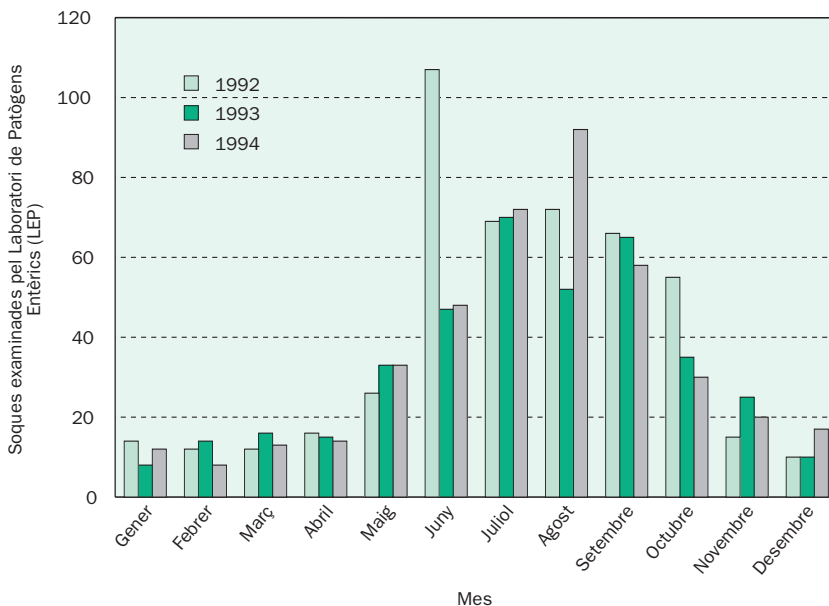
A Canadà altres serogrupos verotoxigènics han estat l'055, l'0125, l'026, l'0126 i l'0121, per aquest ordre de freqüència, però a una distància enorme de l'0157, que ha representat el 93 % de totes les soques verotoxigèniques detectades.

Al Regne Unit també s'han realitzat diversos estudis per conèixer l'epidemiologia de la infecció per *E. coli* O157:H7, i globalment s'ha pogut constatar l'increment de la incidència de la infecció per aquest microorganisme des de 1984 fins a l'actualitat. La majoria dels casos es presenten com a casos esporàdics, o afecten petits nuclis familiars, encara que pot tractar-se de casos de brots més amplis no identificats.

Així mateix, també en aquest país s'ha observat que hi ha diferències geogràfiques i que la incidència més elevada s'ha produït a l'estiu i a la tardor. La majoria dels casos (el 73 %) de gastroenteritis per *E. coli* O157:H7 es presenten entre maig i setembre (figura 7) (196). La incidència més elevada de casos ha estat relacionada amb el món rural (197, 198).

En un treball realitzat a Escòcia (199) durant els anys 1992 i 1993 sobre casos esporàdics, es va poder veure que el màxim nombre de casos corresponia als menors de cinc anys, seguit pel grup de 65 anys i més (figura 8).

**Figura 7. Incidència mensual d'*E. coli* O157 verotoxigèna a Anglaterra i Gal·les**



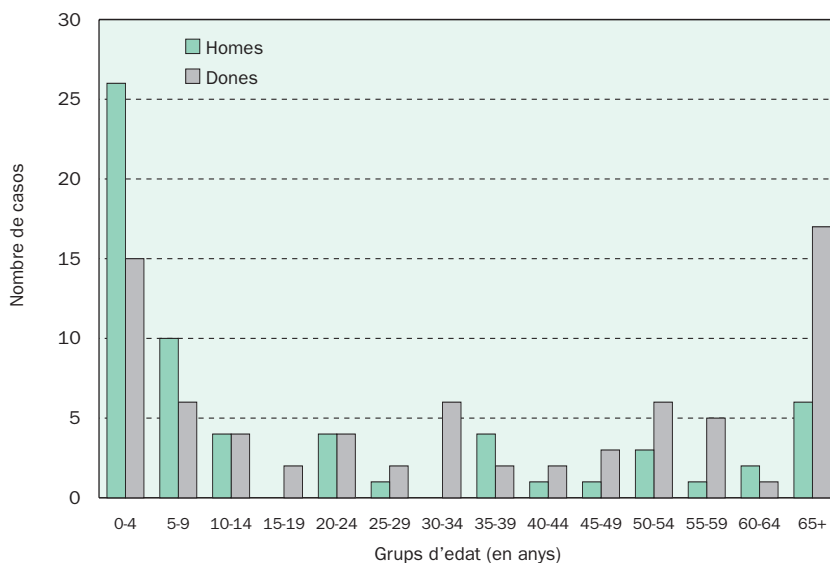
Font: Thomas *et al.* (196).

Pel que fa al sexe, el 54 % dels casos van ser dones, i el 46 % homes, si bé a partir de quaranta anys hi havia més casos del sexe femení que del masculí. El 59 % dels casos estudiats van requerir ingrés hospitalari i el 15 % van desenvolupar una síndrome hemolíticourèmica. La letalitat va ser del 2,9 %. Els factors de risc que presentaven aquests malalts eren, per ordre de freqüència: la manipulació d'aliments crus (40 %), l'exposició a activitats de jardineria o jocs de jardí (36 %), el contacte amb una persona simptomàtica (20 %), el contacte amb fems (17 %), l'abastament privat d'aigua (12 %) i les fallades recents en el subministrament d'aigua (12 %).

També a Escòcia es va fer els anys 1994-1996 un estudi de casos i controls per identificar possibles factors de risc (200). Aquest estudi va posar de manifest que tant el consum de carn elaborada per empreses de *catering* com el consum de carn freda eren factors associats a la infecció.

En un altre estudi realitzat a la regió de Grampian, al Regne Unit (201) es van estudiar al voltant de trenta mil mostres corresponents a pacients amb diarrea durant tres anys. De totes les mostres estudiades, 92 (0,3 %) van resultar positives a *E. coli* O157:H7, amb una distribució per edat i sexe molt similar a la que s'ha mostrat a la figura 8. En aquest estudi, el 36 % dels casos van requerir hospitalització i el 9,6 % van presentar la síndrome

**Figura 8. Distribució per edat i sexe dels casos esporàdics de gastroenteritis per *E. coli* O157:H7**



Font: Coia et al. (199).

hemoliticourèmica. Pel que fa als antecedents de risc, onze eren grangers o ramaders i quatre havien estat exposats a aigua contaminada (4,8 %).

En un estudi realitzat a Cornualla i Devon (202) de l'any 1994 al 1997, es va estudiar unes seixanta-tres mil mostres de femta i van resultar positives a *E. coli* O157:H7 un total de 111 mostres, de les quals només 69 (63 %) van correspondre a casos primaris; d'aquests, quatre (tres menors de dos anys i un de vuitanta anys) van desenvolupar la síndrome hemoliticourèmica. Un total de 23 casos (33 %) havien tingut contacte amb animals de granja en els cinc dies previs a l'inici dels símptomes; en set d'aquests casos es va poder demostrar microbiològicament que hi havia hagut transmissió.

Altres estudis (200, 203-205) també posen de manifest que les visites o el contacte professional a les granges són un factor de risc de contraure la infecció per *E. coli* O157:H7.

A l'Europa continental s'han fet estudis per detectar *E. coli* enterohemorràgica en malalts amb diarrea a nou països. En tots els casos els percentatges d'aïllaments ha estat baix, entre el 0,3 i el 9,3 % per a totes les soques d'*E. coli* verotoxígena i entre el 0 i el 2,7 % per a les soques d'*E. coli* O157:H7. Els països amb major detecció d'*E. coli* verotoxígena han estat Alemanya, Àustria, Suïssa i Holanda, i els menors Sèrbia, Bèlgica, Itàlia i Espanya. Aquesta mateixa proporció es manté quan s'examinen únicament les soques del serotip O157:H7 (176, 206-210).

Les soques verotoxigènes diferents d'O157 que s'han aïllat més sovint han estat l'O26 i l'O111, encara que se n'han detectat disset serogrupos addicionals. Particularment interessant és el serogrup O113, que segueix en freqüència els anteriors i s'ha detectat a sis països, i tot i que no compta amb el mecanisme d'adherència (*attaching and effacing*) s'ha associat a malaltia humana inclosa la síndrome hemoliticourèmica (211).

A Austràlia la incidència d'infecció per *E. coli* enterohemorràgica és molt baixa, i el serotip causant de patologia —colitis hemorràgica i síndrome hemoliticourèmica— aïllat amb més freqüència ha estat l'O111:H<sup>+</sup>, molt superior a l'O157:H7; les soques australianes d'aquest últim serotip només produeixen Stx1 i corresponen al lisotip 14; per tant, podrien correspondre a un clon menys virulent.

A Espanya, un estudi realitzat a Barcelona entre 1992 i 1995 (77) amb 12.793 mostres de femtes de malalts amb diarrea va mostrar que *Campylobacter* i *Salmonella* eren els microorganismes aïllats amb més freqüència (el 25,6 % en ambdós casos) seguit per rotavirus (18,7 %) i giàrdia (9,7 %). A l'estudi no es va detectar cap soca d'*E. coli* enterohemorràgica.

Un altre estudi realitzat a Madrid (212) amb 1.800 mostres de femta corresponents a malalts amb diarrea va mostrar que *Campylobacter* era el microorganisme aïllat més sovint (31,4 %), seguit per *Salmonella* (26,1 %),

*Yersina enterocolitica* (1,9 %) i *Shigella* (0,3 %). En aquest estudi, tampoc es va trobar *E. coli* O157:H7.

Diversos microbiòlegs han efectuat estudis per conèixer la incidència d'*E. coli* enterohemorràgica a Espanya. Tots els treballs han evidenciat una taxa molt baixa de detecció (79, 180-183).

### 3.1.2 Epidemiologia dels brots

Ateses les característiques de gravetat de la malaltia i pel fet que es tracta d'una infecció emergent, els brots epidèmics han estat estudiats acuradament i aporten informació que és d'una gran utilitat per conèixer l'epidemiologia d'aquesta infecció. De fet, la majoria dels elements que actualment s'accepten com a vàlids, tant sobre la cadena epidemiològica de la infecció, com sobre els factors de risc relacionats amb el quadre de gastroenteritis, com amb la síndrome hemolíticourèmica i la púrpura trombòtica trombocitopènica, s'han obtingut dels estudis publicats sobre els brots investigats.

Aquests brots, no només afecten els països desenvolupats, sinó que probablement també afectin els països en vies de desenvolupament, encara que les dificultats diagnòstiques i d'estudi fan que siguin menys coneguts. Així, Isaacson i col·laboradors (213) informen d'un brot de transmissió hídrica que es va produir l'any 1992 a Sud-àfrica i Swazilàndia i que va afectar centenars de persones. De fet, s'han comunicat brots a més de cinquanta països de tots els continents (12).

Els trets fonamentals dels primers brots estudiats als Estats Units, així com els brots estudiats posteriorment en aquell país i en altres països es mostren a les taules 8 i 9.

Entre 1982 i 1996 als Estats Units es van declarar 139 brots amb més de tres mil persones afectades, al voltant del 22 % van ser hospitalitzades, i el 6 % van presentar la síndrome hemolíticourèmica amb una letalitat del 0,6 % (214).

La transmissió va ser provocada en el 67 % del casos per aliments, amb un 22 % de casos secundaris, particularment en guarderies. Els aliments implicats han estat la carn picada i el bistec de vacum, el salami i la llet crua, però també els vegetals. El 1994 un brot per *E. coli* O104:H21 va ser interessant per la raresa del serotip; de les divuit persones que es van poder estudiar cap d'elles no va patir la síndrome hemolíticourèmica, però la majoria va presentar una diarrea hemorràgica. Sorprenentment, la soca no tenia el gen *eae* (215).

Excloent el Regne Unit, a Europa els brots semblen menys freqüents que als Estats Units (30,216). Encara que es difícil controlar tots els brots que es produeixen, fins al 1997 se n'havien registrat disset, dels quals deu eren per l'O157, quatre per l'O111, dos per l'O26 i un per l'O119.

**Taula 8. Brots de colitis hemorràgica i de síndrome hemolíticourèmica més rellevants causats per soques d'*E. coli* O157:H7. Estats Units i Canadà, fins a 1994**

Loc	Any	Casos	Hospitalitzats	Casos que van desenvolupar		Àmbit	Vehicle
				SHU/PTT			
Oregon	1982	26	18	0		Comunitari	Hamburguesa
Michigan	1982	21	14	0		Comunitari	Hamburguesa
Nebraska	1984	34	13	1		Residència de 3a edat	Hamburguesa
Ontario (Canadà)	1985	73	–	12		Residència de 3a edat	Entrepans de carn
Washington	1986	37	17	3		Restaurant	Hamburguesa
Birmingham	1987	26	6	1		Comunitari	Entrepans de gall d'indi
Minnesota	1988	32	4	0		Institut	Hamburguesa
Cabool, Missouri	1990	243	32	2		Comunitari	Aigua
Portland, Oregon	1990	21	7	3		Parc recreatiu	Bany en un llac
Massachusetts	1991	23	6	4		Comunitari	Sidra
Maine	1992	4	–	1		Comunitari	Vegetals
Las Vegas	1992-93	61	–	3		Comunitari	Hamburguesa
Washington, Idaho, Califòrnia i Nebraska	1993	700	195	55		Restaurant	Hamburguesa
Virgínia	1994	20	3	1		Campament d'estiu	Hamburguesa
Washington i Califòrnia	1994	23	6	2		Comunitari	Salami
Ontario	1995	21	8	–		Hospital	Enciam
Connecticut	1996	14	7	3/1		Comunitari	Sidra
Georgia	1996	10	1	1		Comunitari	Piscina
Oest dels Estats Units i Colúmbia Britànica (Canadà)	1996	108	36	2		Comunitari	Sidra
Massachusetts	1997	23	6	4		Comunitari	Sidra
Michigan-Virgínia	1997	108	36	2		Comunitari	Llavors d'alfals
Washington	1997	108	–	–		Parc de caravanes	Aigua
Wyoming	1997-98	157	–	–		Comunitari	Aigua
Wisconsin	1998	43	25	–		Comunitari	Mató
Ontario (Canadà)	1998	10	–	–		Comunitari	Sidra
Texas	1999	58	4	2		Campament juvenil	–
Washington	1999	116	65	11		Comunitari	Aigua

SHU: síndrome hemolíticourèmica.

PTT: púrpura trombòtica trombocitopènica.



**Taula 9. Alguns brots representatius d'*E. coli* O157:H7. Europa i Japó, 1985-1997**

Lloc	Any	Casos	Hospitalitzats	Casos amb SHU/PTT	Àmbit	Vehicle
Anglaterra	1985	24	11	–	Comunitari	Manipulació de vegetals
Regne Unit	1991	16	13	5	Comunitari	logurt
Board (Regne Unit)	1992	6	1	–	Comunitari	Piscina
Bohèmia (Rep. Txeca)	1995	4	4	4	Comunitari	Llet de cabra
Lanarkshire (Escòcia)	1996	>400	–	–	Comunitari	Carn
Sakai (Japó)	1996	7966	606	114	Menjadors escolars	Brots de raves
Alavus (Finlàndia)	1997	14	7	–	Comunitari	Llac
Canàries (Espanya)	1997	15	6	3	Comunitari	Aliment
Escòcia	1997	6	6	–	Nosocomial	–

SHU: síndrome hemolíticourèmica.

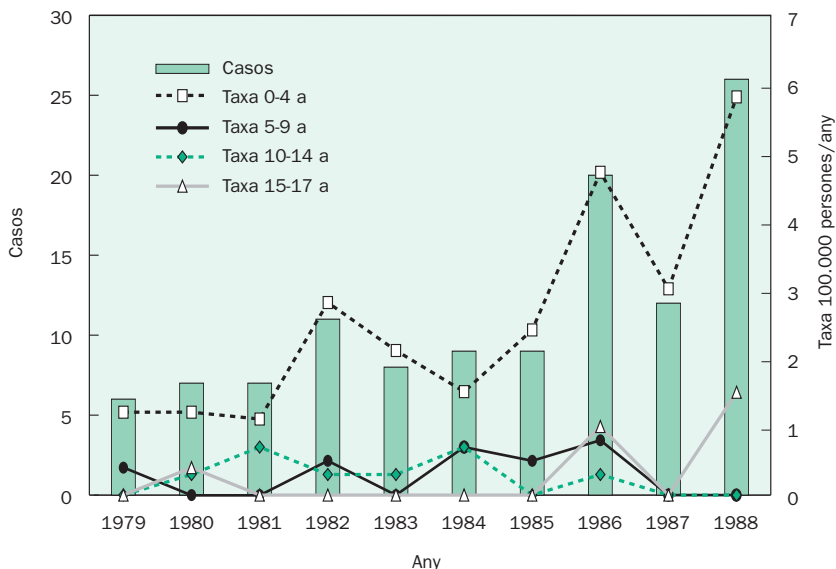
PTT: púrpura trombòtica trombocitopènica.

L'aparició al Japó de setze brots el 1996, moment en què es coneixia bé aquesta patologia, va permetre que es pogués estudiar d'una manera molt detallada. Particularment important va ser el brot esdevingut a la ciutat de Sakay (217), amb 7.966 malalts, 606 persones hospitalitzades i 114 amb síndrome hemolíticourèmica causada per *E. coli* O157:H7. El brot es va produir entre escolars de la ciutat el juny de l'any 1996 (218) i el nombre total d'escoles implicades va ser de 47. Malgrat que no es trobà l'agent causal en les mostres d'aliments analitzades, d'acord amb els resultats de la investigació epidemiològica l'aliment vehiculador va ser un vegetal (brots de raves blancs) que s'havia importat dels Estats Units el gener d'aquell any. Es va arribar a la conclusió que havia de ser un aliment no tractat per la calor i no la carn, perquè aquesta es cuinava a cada escola, i es va considerar altament improbable que a les 47 escoles s'hagués manipulat o tractat incorrectament la carn. Aquest brot va posar de manifest la necessitat de reorganitzar la vigilància epidemiològica per poder detectar precoçment l'aparició de brots i donar-hi una resposta urgent (219).

### 3.1.3 Epidemiologia de la síndrome hemolíticourèmica

Pel que fa a l'epidemiologia de la síndrome hemolíticourèmica, les dades disponibles indiquen que malgrat que altres agents diferents d'*Escherichia coli* O157:H7, com *Shigella dysenteriae* serovar 1, i d'altres que s'han re-

**Figura 9. Taxes d'incidència per grups d'edat de la síndrome hemoliticourèmica. Minnesota, 1979-1988**



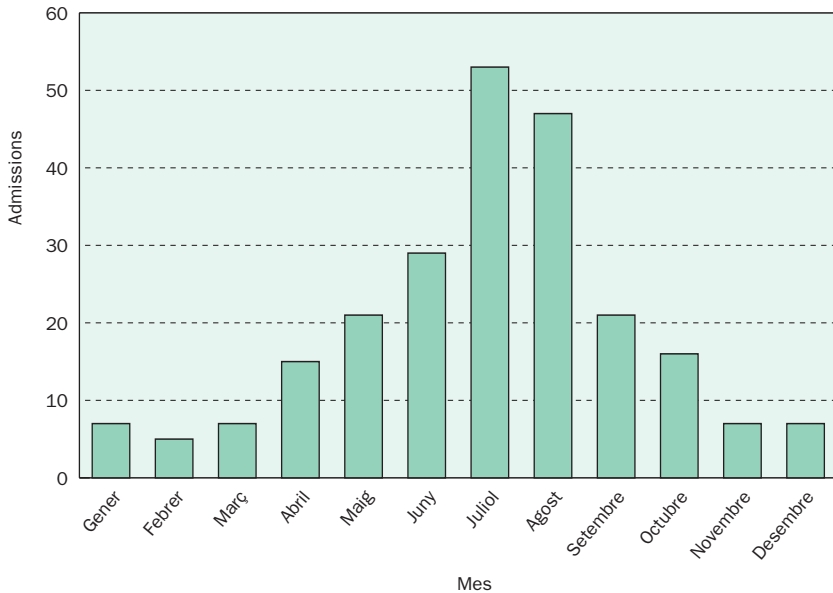
Font: Martin *et al.* (220).

lacionat d'una manera més o menys convincent amb la síndrome, com *Salmonella Typhi*, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Streptococcus pneumoniae*, rickètsies i virus, *E. coli* enterohemorràgica seria l'agent més associat a la malaltia (22).

A Minnesota, Martin i col·laboradors (220), en un estudi realitzat entre gener de 1979 i desembre de 1988 van observar una tendència ascendent de la síndrome hemoliticourèmica (figura 9). També es va observar que 90 dels 117 casos estudiats (el 77 %) corresponien a menors de cinc anys i que la síndrome era més freqüent en el sexe femení (52 %) i en les persones de residència urbana (56 %). Tanmateix, amb excepció de l'edat i del fet d'anar a una guarderia, cap altre variable va resultar estadísticament associada a la malaltia. La taxa d'incidència de la síndrome hemoliticourèmica en menors de cinc anys va ser de 5,8 per 100.000 l'any 1988. Curiosament també la síndrome hemoliticourèmica va mostrar una marcada distribució estacional, de manera que es van concentrar a la primavera i l'estiu la major part dels casos (figura 10) (30).

A Alberta, Canadà, des de 1984 a 1986 es van detectar entre 5 i 22 casos anuals de la síndrome hemoliticourèmica; la major incidència en aquesta

**Figura 10. Distribució estacional d'admissions hospitalàries per la síndrome hemolíticourèmica infantil. Canadà, 1986-1988**



Font: Griffin i Tauxe (30).

província correspon als anys 1987 a 1992, coincidint amb l'increment de la freqüència dels casos d'enteritis per *E. coli* enterohemorràgica (221).

Al Regne Unit en un estudi realitzat durant tres anys (222) el nombre de casos va ser de 81, 97 i 110 respectivament, amb major incidència en nens d'un a dos anys. En els nens afectes d'aquesta patologia, el 28 % de les soques aïllades eren *E. coli* verotoxigena no O157. En un altre estudi sobre la síndrome hemolíticourèmica a Anglaterra es va veure que el 12 % dels infectats per *E. coli* enterohemorràgica patien la síndrome hemolíticourèmica (196).

A França (223), a partir d'una xarxa de nefròlegs pediàtrics que inclou 31 centres hospitalaris, la taxa d'incidència estimada per als menors de cinc anys l'any 1996 va ser d'1,8 per 100.000, entre els quals també s'observa que la malaltia és més freqüent en el sexe femení (52 %) que en el masculí (48 %). La màxima incidència es va produir en els nens d'un any d'edat (taxa >3 per 100.000).

La incidència de la síndrome hemolíticourèmica a Argentina en nens menors de quatre anys és de les més altes del món, i se situa en valors de

22/100.000, que són entre cinc i deu vegades superiors als que es registren als Estats Units, Canadà o el Regne Unit, països en què la incidència de colitis hemorràgica és elevada (224).

D'un estudi realitzat entre 1987 i 1996 de 987 nens amb la síndrome hemolíticourèmica es va constatar que presentaven una edat d'entre 6 i 36 mesos, dels quals el 47 % eren nenes. El 87 % tenia una història prèvia de diarrea, el 80 % amb sang visible macroscòpicament els set dies previs a l'inici de la síndrome hemolíticourèmica; els símptomes més freqüents eren la insuficiència renal (100 %), l'anèmia hemolítica (100 %), la trombocitopènia (98 %) i els símptomes neurològics (46 %). El 56 % va requerir diàlisi peritoneal, i entre el 0,3 i el 6 % van presentar alteracions neurològiques permanents com hemiparèsia, moviments involuntaris, atròfia òptica, convulsions o retard mental. El 44 % va presentar cert grau d'insuficiència renal crònica. La letalitat a la fase aguda va ser de l'1 %. El risc de patir la síndrome hemolíticourèmica es va associar a colitis hemorràgica, febre durant la fase d'estat de la malaltia i a l'administració de cotrimoxazole (225, 226).

A Argentina i altres països de Sud-amèrica el serotip O157:H7 és infreqüent, i es detecten al seu lloc els serotips immòbils O1, O2, O15, O21, O25, O26, O75, O111, així com O49:H10, O92:H3 i O103:H2 (227, 228).

## 3.2 Cadena epidemiològica

### 3.2.1 Reservori animal

El tracte intestinal del bestiar és un reservori important d'*Escherichia coli* verotoxígena (229, 230), i s'hi troben implicades diverses espècies animals entre les quals destaquen especialment els remugants. En aquests animals s'ha detectat la presència d'*E. coli* O157:H7, així com d'altres serotips enterohemorràgics.

Resulta essencial un control adequat dels procediments durant la manipulació dels animals a l'escorxador, per evitar la contaminació fecal de la carn (230, 231), i a les granges per evitar que es contamini la llet durant el munyit. També és interessant avaluar la possibilitat d'emprar bacteris probiòtics per reduir el grau de colonització.

#### *Espècies animals com a reservori*

L'espècie animal més vegades implicada en la transmissió d'*Escherichia coli* enterohemorràgica ha estat la bovina (232-235). De tota manera, també s'ha aïllat *Escherichia coli* O157:H7 d'altres animals com són el bestiar oví, el porcí, l'aviram i d'altres animals com gossos, cavalls i ocells (229-239).

En avaluar la importància del reservori animal, Chapman *et al.* (237) van observar que el 15,7 % del vacum sacrificat era portador d'aquest bacteri,

que també es va aïllar en el 2,2 % de les ovelles i en el 0,4 % dels porcs. En aquest estudi no se'n va aïllar cap soca als pollastres; això indica que, entre els animals d'abast, el grup més important és el del bestiar vacum, per sobre de l'oví i el porcí.

Pel que fa a la prevalença en el bestiar vacum, si es considera el tipus de producció, l'estudi (237) va mostrar que el 13 % dels animals productors de carn eren portadors, mentre que en els animals lleters la prevalença era del 16 %; tanmateix, aquesta diferència és molt baixa i no significativa. En altres estudis no s'observaren diferències entre els animals en funció de la seva producció (240).

Han estat poc implicats els productes d'origen oví en brots d'*Escherichia coli* enterohemorràgica. No obstant això, s'obtenen aïllaments positius d'*Escherichia coli* verotoxígena, especialment d'O157:H7, d'ovelles i xais (229). Això indica que si bé el bestiar vacum és el reservori majoritari, potser, l'oví pot constituir un problema en el futur, segons el nivell del seu consum i de les pràctiques higièniques emprades durant la seva manipulació i elaboració (229, 236).

Les dades de què es disposa indiquen que, a més del bestiar en general i del vacum en particular, potser caldria considerar altres reservoris (241) com els cavalls i els gossos. Les mosques a les granges poden actuar com a vectors.

### **Localització d'*E. coli* enterohemorràgica en els animals**

Una de les peculiaritats dels rumugants és la seva característica de poligàstrics. L'estómac d'aquests animals es divideix en rumen, reticle o bonnet, llibret i quall. A causa del metabolisme específic, caracteritzat per la producció d'àcids grassos, al rumen hi ha un pH àcid d'entre 5 i 7 com a conseqüència de les fermentacions dels aliments. L'absència d'alimentació, en disminuir les fermentacions al rumen (i en part també al cec), faria augmentar el pH i facilitaria la multiplicació dels enterobacteris incloent els enteropatògens com la salmonel·la i *E. coli* verotoxígena. (234, 242, 243).

Alguns autors han assenyalat que el rumen en aquests animals podria ser un reservori d'*E. coli* O157:H7, però això no ha estat comprovat; el que sí que és probable és que la concentració del microorganisme al rumen, i per tant l'excreció per la femta, sigui molt variable.

Efectivament, l'excreció d'*E. coli* O157:H7 és irregular en molts animals, però això pot dependre de diversos factors a part del rumen. Entre aquests factors es troben l'època de l'any i l'edat de l'animal. Segons els mateixos autors (234), *Escherichia coli* O157:H7 s'aïlla del rumen i del llibret de tots els animals que ingereixen experimentalment el bacteri, del reticle en el 65 % dels animals, mentre que no s'aïlla del quall. Aquestes diferències de localització en els diferents compartiments estomacals es pot deure al fet que el quall és molt semblant a l'estómac dels monogàstrics, és a dir, les

condicions de pH són extremadament àcides i això pot limitar els aïllaments d'*Escherichia coli* O157:H7 en aquesta zona. Entre aquests compartiments estomacals el rumen és el més important, ja que s'hi detecta el microorganisme durant llargs períodes de temps (234, 244). El rumen, per tant, constitueix un reservori del bacteri en els remugants. El microorganisme no es detecta a les zones proximals del budell (243), però sí en els trams distals del budell prim, així com en la totalitat del còlon i el recte (234, 238, 243, 245).

Aquesta situació és també observable en el bestiar oví, amb la diferència que la concentració d'*E. coli* O157:H7 és considerablement inferior a les detectades en el bestiar vacum, la qual cosa explicaria que en ocasions sigui difícil detectar el microorganisme (236).

Es considera que la flora coliforme a l'intestí dels bòvids és molt variable. Diversos serotips d'*E. coli* s'estableixen temporalment i amb una mitjana de dos mesos desapareixen en l'animal per ser substituïts per d'altres (246-250); aquesta dinàmica sembla que també és la pròpia de les soques verotoxígenes, incloent-hi l'O:157:H7, això no vol dir que en el conjunt d'una granja un serotip (incloent l'O157) no pugui romandre més temps entre el conjunt d'animals.

Diferents estudis coincideixen en el fet que en més del 5 % del bestiar considerat sa hi ha *Escherichia coli* O157:H7 a la femta (231, 251-253). No obstant això, en models experimentals s'ha vist que els nivells d'eliminació d'aquest microorganisme disminueixen de forma important a partir dels catorze dies després de la seva inoculació ( $10^8$  ufc/g), desapareixen quasi del tot de la femta ( $< 5$  ufc/g) (234) fins a l'eliminació total d'*E. coli* O157:H7, que sol ser al voltant de trenta dies, de manera que després d'un mes que l'animal s'ha contaminat el risc de transmissió als humans disminueix considerablement (246).

*Escherichia coli* O157:H7 s'elimina per la femta però també pot aïllar-se de la pell dels animals, així com dels canals, de la carn i de la llet després de la seva contaminació amb matèria fecal (231). La localització extradigestiva del microorganisme és deguda a contaminacions durant la manipulació i/o el processament de les canals, les carns o la llet, i no a la infecció sistèmica pel microorganisme

### **Localització d'*E. coli* enterohemorràgica en l'entorn animal**

*Escherichia coli* O157:H7 no només es troba al budell dels animals colonitzats, sinó que també es pot aïllar de diferents superfícies que estan o han estat en contacte amb la matèria fecal dels animals portadors. Així, es considera que entre el 3 % i el 4 % de les menjadores estan contaminades pel bacteri, de la mateixa manera que ho està el 2 % de les superfícies de les granges afectades (241).

S'ha assenyalat la possibilitat d'una llarga pervivència d'aquestes soques en el medi inanimat. Diversos llocs apunten la matèria fecal com a reservori temporal del microorganisme, així com també les lleres dels rius o les aigües, on es podria localitzar el bacteri immers en la matèria orgànica en la qual sobreviuria durant llargs períodes de temps (241, 254).

Efectivament, l'aigua dels abeuradors pot constituir un dels elements fonamentals en la disseminació del microorganisme. Shere *et al.* (245) van observar que la via de contaminació més important a la granja era l'aigua; però en el seu cas, el sistema de beguda es basava en tancs hermètics, per la qual cosa la contaminació fecal directa no era possible, i van concloure que s'havia d'haver produït una contaminació fecal-oral i de la boca als sistemes de beguda, i després devia haver passat de l'abeurador als diferents animals.

Probablement l'aigua haurà de ser un dels principals medis que s'han de controlar a les granges per tal de prevenir la disseminació del microorganisme (245).

### **Influència de l'edat de l'animal**

Encara que habitualment s'ha senyalat el bestiar, en general, com a reservori d'aquests microorganismes, alguns investigadors han documentat una major susceptibilitat a la colonització en animals joves (233, 236, 251). Així, els animals deslletats i joves són molt més receptius al microorganisme que els adults (236, 251). Aquests animals, a diferència dels adults, eliminaran *E. coli* enterohemorràgica amb la femta durant llargs períodes de temps (234). No obstant això, Blanco *et al.* (233) troben que no hi ha diferències en l'aïllament de soques verotoxígenes procedents de vaques i vedelles. En ambdós casos es van detectar nivells d'aïllament entorn del 35 % dels animals estudiats.

Aquesta relació entre l'edat i la freqüència d'aïllament d'*Escherichia coli* O157:H7 sembla que es modifiqui en alguns estudis quan es tracta de vaques lleteres. En aquest tipus de producció, el major nombre d'aïllaments s'obté dels adults (229, 237). No es coneix la causa d'aquest fet que caldria confirmar.

### **Influència de l'època de l'any**

Sembla que hi ha un marcat factor d'estacionalitat en l'eliminació d'*E. coli* O157:H7 en la femta dels animals. Aquesta estacionalitat es localitza justament a partir de juny o juliol fins al mes de setembre (236, 237). La prevalença, durant els mesos de major aïllament d'aquest microorganisme, oscil·la entre el 5 % i el 37 % (237). L'existència d'un elevat nombre d'aïllaments d'*E. coli* enterohemorràgica durant els mesos d'estiu coincideix amb l'època en la qual es produeixen la majoria de brots en humans.

Curiosament, animals que eliminen *E. coli* O157:H7 durant l'estiu no l'eliminen en altres èpoques de l'any. Els estius següents, els mateixos animals o d'altres poden eliminar el bacteri, de manera que en una granja no són sempre els mateixos animals els que actuen com a excretors d'*E. coli* enterohemorràgica (236).

### **Influència de l'alimentació**

L'alimentació és un factor que té un paper essencial en l'eliminació d'*E. coli* enterohemorràgica en la femta dels animals (255). Diferents autors han assenyalat la importància de la seva qualitat i varietat. De tota manera, la qualitat de l'alimentació no influeix en la persistència d'*E. coli* enterohemorràgica. És a dir, una modificació en la dieta no es traduirà en una desaparició del bacteri de l'intestí de l'animal, sinó en la quantitat de bacteris que s'eliminen per la femta. Així doncs, canvis en l'alimentació que substituïssin alfals per herba indueixen a increments en el nombre de bacteris detectables en la femta dels portadors (236).

Aquesta observació s'ha justificat pel fet que la dieta influeix en l'acidesa del contingut intestinal. Com ja s'ha assenyalat, quan els animals són alimentats amb gra, en lloc de fenc, es produeix una acidificació intestinal que facilita la reducció dels enterobacteris (26).

D'altra banda, canvis de l'alimentació que impliquin un dejuni més o menys perllongat afectaran l'eliminació d'*E. coli* enterohemorràgica i n'incrementaran el nombre (251, 255). Quan els animals pateixen un estrès per manca d'alimentació, període durant el qual baixa la concentració d'àcids al rumen, són més susceptibles d'ésser colonitzats per *E. coli* O157:H7 i el nivell d'eliminació per la femta és superior.

La dieta, que disminueix l'acidesa del rumen, l'estrès i l'amuntegament dels viatges facilitarien la transmissió i la colonització estable dels animals pels patògens.

### **Poder patògen i simptomatologia en els animals**

*Escherichia coli* O157:H7 no sembla tenir poder patògen per al bestiar adult (231, 236, 251). Brown *et al.* (234), però, després de contaminar pinso de vedells amb *E. coli* O157:H7 van observar que el 35 % del bestiar manifestava hipertèrmia i/o febre durant cinc dies i el 62 % va tenir diarrea durant deu dies encara que mai no va ser hemorràgica. Finalment, es va apreciar l'existència d'anorèxia i un desenvolupament insuficient en el 12 % dels animals. S'ha de recalcar que la concentració de microorganisme inoculat fou de 10<sup>8</sup> ufc/g en una única dosi de 250 g.

Sembla confirmat que en el període neonatal diversos tipus d'*E. coli* enterohemorràgica com l'O5:H7, l'O8:H8, l'O26:H11, l'O28:H19, l'O103:H2, l'O111:H7, l'O118:H7, i també l'O157:H7, entre d'altres, produeixen diarrea.



Els serotips involucrats en la patologia produeixen la Stx1 i tenen el gen *eae*. Recentment s'ha assenyalat la importància del tipus de verotoxina de la soca aïllada. S'ha suggerit que només les soques Stx1 poden produir patologia en els animals (233), encara que la Stx2 sembla que és la més lesiva per a l'home. Segons els mateixos autors, es poden aïllar soques verotoxigenes d'*Escherichia coli* procedents de granges sense animals malalts i, per contra, també poden ser aïllades de granges amb animals amb diarrea.

### **Serotips d'*E. coli* enterohemorràgics aïllats en el reservori animal**

Dels diferents serotips enterohemorràgics associats a la infecció en humans, el que s'ha aïllat més sovint en animals ha estat l'O157:H7; la majoria presenten el gen *eae* i produeixen verotoxines del tipus 2 (Stx2) (229, 232, 233, 235, 257-259). El serotip O157:H7 sembla formar part d'un mateix clon el qual es troba àmpliament distribuït (257). S'ha aïllat i s'ha identificat en animals i molt especialment en el bestiar vacum (236, 241), encara que la freqüència d'aïllament és en general baixa, calculada entre l'1 % i el 6 % (10, 231, 233, 235, 241).

També s'ha trobat al bestiar oví (229, 236, 260) i en els cèrvids (261). La prevalença d'aquest serotip és inferior a l'Europa continental que al Regne Unit o als Estats Units (237). Les soques aïllades a partir del porc presenten l'Stx2e, que no té capacitat patològica per a l'home (237).

En alguns animals es pot observar l'aïllament simultani de diferents serotips (233, 236, 240) i es pot estimar que aquesta circumstància es produeix en aproximadament del 20 % al 75 % dels animals positius (233). Al mateix temps, el serotip aïllat no sempre és el mateix, sinó que pot variar amb el temps (236, 240).

L'aïllament i la identificació dels diferents serotips depèn de la metodologia emprada. La utilització de sistemes d'immunocaptura amb micropartícules magnètiques permet detectar una proporció més alta de soques del serotip O157:H7 (235).

S'han detectat en els bòvids més de 325 serotips verotoxigènics, encara que només un reduït nombre s'han trobat sovint en els diferents països, entre els quals destaquen l'O20:H19, l'O22:H8, l'O26:H11, l'O45:H<sup>-</sup>, l'O82:H8, l'O103:H<sup>-</sup>, l'O113:H4, l'H21, l'O116:H21, l'O153:H25, l'O157:H7, l'O171:H2, l'O172:H21 i l'O174 (OX3):H21, l'H2 i l'H<sup>-</sup>.

Cal tenir en compte, però, que no totes les soques verotoxigènics aïllades en els bòvids tenen tots els factors de virulència ni s'han aïllat de l'home i han produït patologia (232, 233, 235).

El serotip verotoxigènic predominant en els bòvids a Europa és l'O113:H21, a Amèrica i Austràlia és l'O26:H11, i al Japó són l'O45:H8 i l'O145:H<sup>-</sup>.

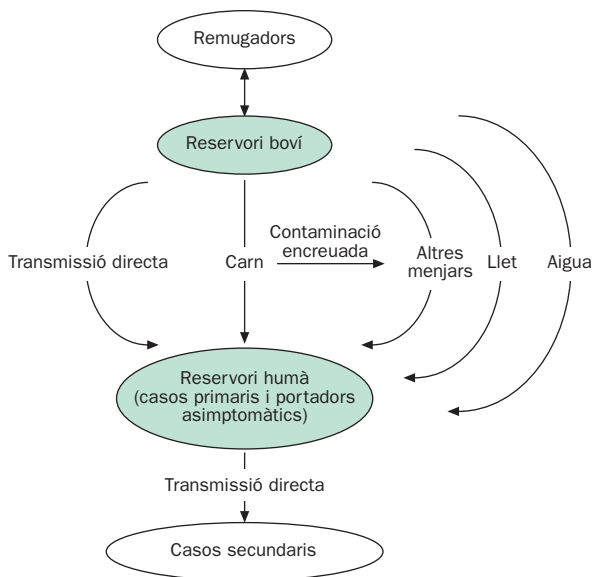
Segons un estudi realitzat per l'Institut Municipal de Salut Pública de Barcelona, de mil mostres fecals obtingudes de contingut intestinal en bòvids, des de l'abril de 1999 fins al març de 2000, 88 han estat positives per a *E. coli* O157 (84, O157:H7; 3, O157: H<sup>-</sup>; 1, no determinat) i 84 de les 88 soques eren productores de verotoxina.

Per a informació sobre *E. coli* verotoxigena en el reservori animal es pot consultar <http://www.lugo.usc.es/ecoli>.

### 3.2.2 Reservori humà

L'home també actua com a reservori d'*E. coli* O157:H7, encara que amb molta menys importància que el reservori animal (figura 11). Aquest caràcter està en relació amb la seva capacitat de persistir temporalment tant en casos com en portadors asimptomàtics, com s'assenyala més endavant. De fet, l'hàbitat primari és el tracte digestiu dels remugadors, fonamentalment els bòvids i d'altres animals, mentre que l'hàbitat secundari seria l'aigua, els sediments, el terra i els aliments. Per completar amb èxit la seva difusió, *E. coli* O157:H7 ha de ser capaç de sobreviure un temps en l'hàbitat secundari i posteriorment arribar a colonitzar un nou hoste del reservori animal o humà (7, 262).

**Figura 11. Reservoris i mecanismes de transmissió d'*Escherichia coli* O157:H7**



Font: Armstrong *et al.*, modificada (9).

### **Mecanismes de transmissió**

*E. coli* O157:H7 té dos mecanismes de transmissió possibles, un de directe, de persona o animal infectat a persona sana, i un altre d'indirecte a través dels aliments o de l'aigua contaminats (263). Aquest segon mecanisme és molt més important, ja que a partir d'un animal infectat es poden produir molts casos. S'ha documentat la transmissió d'*E. coli* O157:H7 a través de carn de bòvids insuficientment tractada per la calor (especialment carn picada), llet crua o derivats (264-266), i també fruites o vegetals que s'hagin pogut contaminar amb femta de remugadors (per l'aigua del rec o perquè estaven emmagatzemats en llocs a on hi ha contacte amb excrements d'aquests animals). Vegetals diversos (fulls d'enciam, brots d'alfalç) han estat vehicle de brots importants. S'ha de tenir en compte que als vegetals *E. coli* pot créixer a 12 °C (9), i que la pràctica de submergir-los en aigües que continguin lleixiu redueix però no elimina l'agent infecció (184).

L'aigua també ha estat implicada com a vehicle d'infecció per *E. coli* O157:H7, tant pel consum, com pel contacte amb aigües recreatives (piscines, estanys...) i deglució involuntària. Ha estat repetidament demostrat que *E. coli* O157:H7 pot sobreviure diversos dies en aigües que no estiguin clorades adequadament.

La transmissió directa es produeix quan una persona sana té contacte amb una persona o un animal que excreta *E. coli* O157:H7, a través d'un intercanvi fecal-oral amb la participació de les mans. El contacte amb una persona infectada és el mecanisme pel qual es produeixen els casos secundaris en els brots per consum d'aliments o aigües contaminades (figura 11).

La transmissió directa de l'animal infectat a la persona la van demostrar Louie i col·laboradors (240) mitjançant tècniques d'epidemiologia molecular. La dosi infectant d'*E. coli* és molt baixa (9, 267), i n'hi ha prou amb unes poques desenes de bacteris perquè es produeixi la infecció. Fins i tot menys d'una desena d'organismes han originat casos (268). Per aquest motiu, perquè la susceptibilitat per a la infecció és elevada en els nens petits, perquè aquests encara no tenen uns hàbits higiènics assolits, i perquè constantment exploren amb les mans tot el que els és nou o els crida l'atenció, els casos secundaris són freqüents en nens petits i especialment a les guarderies. Tanmateix, els casos secundaris per transmissió persona-persona poden aparèixer entre persones de qualsevol edat.

### **Període d'incubació**

El temps transcorregut entre l'exposició a *E. coli* O157:H7 i l'aparició de manifestacions clíniques és molt variable, i pot oscil·lar entre un i catorze dies, (264) encara que la majoria de les vegades se situa al voltant dels tres o quatre dies (262).

### **Període de transmissibilitat**

El període de temps durant el qual una persona infectada elimina bacteris amb la femta és molt variable segons que es tracti d'adults o de nens. En els adults aquest període acostuma a ser d'una setmana, però en els nens el període de transmissibilitat s'allarga molt més (269). En un estudi realitzat amb 110 nens infectats que anaven a guarderies es va observar que la mediana del període de transmissió va ser de 19 dies (270a, 270b). En aquest mateix estudi en un nen que havia rebut amoxicil·lina l'excreció va ser de 62 dies (270a). Altres autors (271) també assenyalen que l'antibioteràpia allarga el període d'excreció. En l'estudi de Karch i col·laboradors s'observà que la mediana de duració de l'excreció era inferior en els pacients amb diarrea o colitis hemorràgica (13 dies) que en els pacients que desenvoluparen la síndrome hemolíticourèmica (21 dies); en un d'aquests pacients l'excreció va durar 124 dies (272a).

### **Hoste susceptible**

La susceptibilitat a la infecció per *E. coli* O157:H7 és general. No es coneix immunitat natural enfront de la infecció. De fet, s'han observat infeccions recurrents en nens sense cap immunodeficiència coneguda, la qual cosa suggereix que les exposicions repetides incrementen el risc d'emmalaltir en comptes de disminuir-lo. Això també afectaria els grangers i les seves famílies (179), encara que altres autors (265) assenyalen que els grangers podrien tenir anticossos protectors a causa del contacte repetit amb la toxina.

Els estudis duts a terme dels brots i casos esporàdics suggereixen que la susceptibilitat és màxima en les edats extremes de la vida, és a dir, els menors de cinc anys i en les persones majors de 65 anys.

El risc de complicacions i mort és màxim en la gent gran, en els quals la letalitat pot arribar al 35 % (272b). En els nens el risc de complicacions, especialment de l'aparició de la síndrome hemolíticourèmica, és del 3-7 % en els casos esporàdics i de fins al 20 % en alguns brots. La letalitat d'aquesta síndrome se situa al voltant del 3-5 % (12). El sexe femení s'ha relacionat amb un major risc de desenvolupar la síndrome hemolíticourèmica. Probablement aquest fet es podria explicar, almenys en part, perquè les dones tenen més cura dels nens petits tant a la llar com a les guarderies, i per tant tindrien un risc més alt d'exposició al bacteri.

S'ha observat una susceptibilitat augmentada en persones gastrectomitzades, la qual cosa suggereix que encara que l'acidesa gàstrica no afecta tant *E. coli* O157:H7 com altres bacteris, pot ser que desenvolupi algun paper en la defensa enfront d'*E. coli* O157:H7.

Encara que les infeccions asimptomàtiques per consum d'aliments o aigua contaminats o per contacte amb persones que els han ingerit poden esde-

venir en una proporció no coneguda, sembla que *E. coli* O157:H7 no forma part de la flora intestinal humana, i per tant no s'accepta l'existència d'un reservori humà permanent (273).

Com a estratègia de futur es planteja que una manera de disminuir el nombre d'hostes susceptibles seria administrar una vacuna que s'obtingués atenuant les verotoxines (22, 274, 275). Aquesta vacuna, si se'n pogués disposar, estaria especialment indicada en les persones que tenen una susceptibilitat augmentada a la infecció.

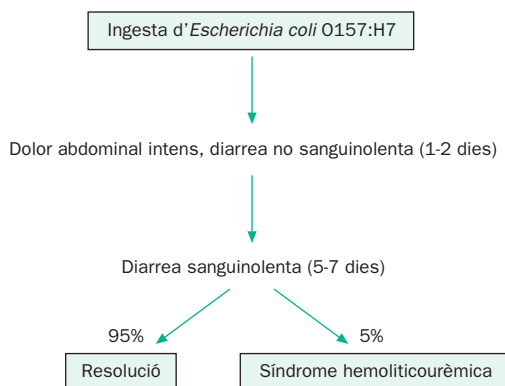
## 4. Patogènia i clínica de les infeccions per *E. coli* verotoxígena

### 4.1 Patologia causada per *E. coli* verotoxígena

L'enteritis per *E. coli* enterohemorràgica es caracteritza per un quadre de dolor abdominal amb diarrea que en la majoria dels casos s'acompanya de sang (colitis hemorràgica) i que evoluciona cap a la curació espontània. En un percentatge baix però significatiu de casos, al voltant d'una setmana després de l'inici dels símptomes pot aparèixer una síndrome hemoliticourèmica o una púrpura trombòtica trombocitopènica; posteriorment alguns d'aquests malalts presenten evidència de nefropatia crònica amb proteinúria, hipertensió o reducció del filtrat glomerular. En tots els estadis de la malaltia es poden presentar altres complicacions, com deshidratació i anèmia (figura 12). El quadre clínic descrit, en la seva forma més expressiva i completa, és característic d'*E. coli* O157:H7, però també es dona en les infeccions per altres serotips enterohemorràgics (taula 3).

Després de la ingesta d'*E. coli* enterohemorràgica, el microorganisme colonitza el budell i, encara que no es coneix amb precisió el lloc de màxima colonització, es pensa que podria ser el còlon ascendent. Com ja s'ha assenyalat prèviament (vegeu l'apartat 2.3.1), l'adherència respon a un mecanisme específic que comporta una alteració caracteritzada per l'esborra-

**Figura 12. Història natural de la infecció per *E. coli* O157:H7**



Font: Mead i Griffin (12).

ment de les microvellositats dels enteròcits (*attaching and effacing*) que també es dona a les infeccions per *E. coli* enteropatògena clàssica. Aquesta alteració per si sola pot produir diarrea no hemorràgica.

La verotoxina té efecte, probablement, sobre les cèl·lules (enteròcits) i sobre l'endoteli de la microcirculació del budell, i ambdós fets comporten les lesions pròpies de la colitis hemorràgica. Des del punt de vista histopatològic s'observa hemorràgia, edema en la làmina pròpia i àrees de necrosi focal superficial.

La toxina que ha travessat la barrera intestinal (116) actua sobre les cèl·lules dels capil·lars de la microcirculació intestinal, renal i del sistema nerviós central.

Les lesions de les cèl·lules endotelials causades per la toxina desencadenen i promouen el dipòsit de fibrina i de plaquetes als capil·lars, i lesionen els hematies que passen a través seu, els quals adquireixen l'aspecte morfològic característic i poden hemolitzar-se; tot això pot cloure la microcirculació del ronyó i causar insuficiència renal; però, com s'ha assenyalat, en ocasions també s'afecta el sistema nerviós central, com succeeix en el cas de la púrpura trombòtica trombocitopènica.

Encara que per les dades disponibles es pot assegurar que hi ha una acció directa de les toxines sobre les cèl·lules, és possible que l'actuació de citocines cooperi al desenvolupament de les lesions (vegeu l'apartat 2.3.1).

## 4.2 Manifestacions clíniques

La infecció per *E. coli* O157:H7 es presenta amb una varietat de manifestacions clíniques. La simptomatologia és gairebé sempre expressió de l'afectació intestinal, però també es poden observar símptomes d'afectació extradigestiva. També hi ha infeccions asimptomàtiques.

### 4.2.1 Infecció asimptomàtica

S'han detectat infeccions asimptomàtiques per *E. coli* O157:H7 en brots epidèmics. És bastant difícil avaluar la seva incidència, ja que és infreqüent el cultiu de mostres de femtes de persones asimptomàtiques. En una epidèmia de nens estudiada a Canadà, un 31 % dels exposats a la font d'infecció no van tenir símptomes, i en un 53 % d'aquests es va aïllar al laboratori *E. coli* O157:H7 (276).

### 4.2.2 Infecció simptomàtica

La fase simptomàtica s'inicia després del període d'incubació.

El marge del període d'incubació és ampli: oscil·la des d'un a catorze dies (264, 277) encara que la majoria del casos apareixen abans de quatre dies (262).

Per les dades publicades en diversos brots epidèmics estudiats, s'accepta que si no apareix diarrea al cap de dues setmanes de la ingesta del suposat aliment contaminat el risc de patir la infecció és negligible.

Els malalts presenten un curs clínic bastant regular i previsible que es pot dividir en dos períodes diferents, un d'inicial de diarrea aquosa sense sang, i el segon caracteritzat per l'aparició de diarrea sanguinolenta (278). Quan comença la malaltia, de vegades abans de l'aparició de la diarrea s'observen símptomes generals, que no solen afectar més del 30 % dels casos, com febrícula, dolor abdominal de tipus còlic, que pot ser intens, somnolència, irritabilitat i vòmits. En els nens aquests símptomes es poden observar en els pròdroms de diversos processos i és quan s'inicia la diarrea que el metge pensa en una enteritis i sol·licita el cultiu de la femta.

En aquesta fase, si el dolor abdominal és molt intens, es pot pensar a donar un tractament simptomàtic, però en els nens sempre és preferible no donar un medicament per disminuir el peristaltisme intestinal, sobretot si hi ha possibilitat que la causa sigui aquesta infecció, en la qual això està rigorosament contraindicat ja que pot afavorir l'aparició de la síndrome hemolíticourèmica. En una epidèmia a Washington el 1993 es va observar que la diarrea amb sang durava més en els nens que havien pres medicació antiperistaltògena que en els que no n'havien pres (279).

L'absència de sang a la femta pot fer que el clínic no pensi que el malalt pot estar infectat per *E. coli* verotoxígena, encara que un dolor abdominal molt intens pot ser sospitós. S'ha d'esbrinar si el malalt visitat és un cas d'un brot i en cas afirmatiu intentar saber si ja es coneix l'agent etiològic. Al voltant d'un 10 % al 30 % dels casos no apareix sang a la femta (187, 201, 280-282). Per contra, en el curs clínic típic després d'un o dos dies d'evolució de la diarrea líquida apareixen deposicions hemorràgiques. Es pot tractar d'una femta lleugerament sanguinolenta o d'una hemorràgia intestinal franca (colitis hemorràgica) acompanyada habitualment d'un dolor abdominal intens. En aquesta fase no hi sol haver febre i acostuma a durar entre quatre i vuit dies.

Els estudis de laboratori acostumen a mostrar leucocitosi amb moderada desviació a l'esquerra. L'hematòcrit no sol estar disminuït malgrat la presència de sang a la femta si no hi ha una hemorràgia d'altra causa. Els estudis bioquímics, incloses les proves hepàtiques, proves de coagulació i el sediment d'orina, habitualment són normals.

La diarrea hemorràgica i l'intens dolor abdominal són dos símptomes cardinals que han de fer sospitar de la infecció per *E. coli* verotoxígena; és molt important informar el microbiòleg d'aquesta sospita perquè es puguin posar en marxa els procediments específics per a la detecció d'aquest patògen. Als països en què aquestes infeccions són molt poc freqüents, lò-



gicament, els laboratoris de microbiologia no incorporen regularment les tècniques per al seu diagnòstic dins del protocol d'estudi dels agents causants d'enteritis. Els centres de control i prevenció de malalties (CDC), als Estats Units, han assenyalat que en aquell país només un 50 % de laboratoris busquen de manera rutinària *E. coli* O157:H7 en totes les mostres de femta (283).

La radiografia simple de l'abdomen mostra la presència d'un ili en un nombre elevat de casos, i una distensió del budell prim, el cec i el còlon ascendent, i poc gas en el còlon esquerre. L'enema opac mostra una imatge d'edema de la submucosa en el còlon transvers i ascendent, i engruïment dels plects de la mucosa del còlon (18).

La colonoscòpia permet veure les anomalies de la mucosa del recte i el cec caracteritzades per edema, eritema i ulceracions superficials de distribució irregular, i de vegades pseudomembranes (284, 285). Quan hi ha hemorràgia les lesions al cec i el colon ascendent són més importants.

La recuperació en la majoria dels casos de colitis hemorràgica es produeix al cap d'una setmana i sense tractament específic. El temps d'hospitalització oscil·la de sis a catorze dies, en general més temps com més joves són els pacients.

També poden aparèixer complicacions com una hemorràgia digestiva alta, que es confirmarà amb la col·locació d'una sonda nasogàstrica i que pot donar lloc a una anèmia amb la davallada de l'hematòcrit, hipotensió arterial i com a conseqüència una isquèmia cerebrovascular.

En el diagnòstic diferencial d'aquesta entitat s'han de considerar en primer lloc totes les enteritis que cursen amb la presència de sang a la femta (campilobacteriosi, salmonel·losi, shigel·losi, gastroenteritis per *E. coli* enteroinvasiva, yersiniosi, colitis per *C. difficile*, amebiasi). Totes aquestes malalties se solen presentar amb febre alta, i en canvi la diarrea amb sang és menys important que l'observada en les colitis hemorràgiques per *E. coli* O157:H7, encara que no sempre és així. En segon lloc, s'ha de diferenciar de l'inici d'una malaltia inflamatòria intestinal; en aquesta, els estudis microbiològics són negatius i l'aspecte endoscòpic generalment proporciona les dades diferencials. Per l'absència de febre també es pot confondre amb una hemorràgia d'altres causes, una intussuscepció, una colitis isquèmica, una diverticulitis o una apendicitis (118, 286).

#### **4.2.3 Síndrome hemoliticourèmica**

Entre un 5 % i un 10 % dels malalts menors de deu anys, i també en els ancians encara que és més difícil de quantificar-ne la freqüència, les infeccions per *E. coli* O157:H7 desenvolupen una síndrome hemoliticourèmica entre cinc i nou dies després del començament del quadre clínic. Els pa-

cients que no presenten diarrea sanguinolenta tenen el mateix risc de desenvolupar una síndrome hemolíticourèmica que els que presenten una colitis hemorràgica.

Si a partir dels dos o tres dies després de passada la diarrea no hi ha signes d'anèmia hemolítica no s'ha de preveure l'aparició de la síndrome hemolíticourèmica (287).

Aquesta síndrome es caracteritza per la triada d'anèmia hemolítica microangiopàtica, trombocitopènia i insuficiència renal.

Encara que han estat implicades diverses causes en el seu desenvolupament, com factors genètics, embaràs, drogues, toxines, agents químics, virus i bacteris, probablement en nens i vells la causa més freqüent es la infecció per *E. coli* verotoxígena, i és aquest procés la primera causa d'insuficiència renal aguda en els nens.

La patogènia ja ha estat assenyalada; la verotoxina produeix una alteració de l'endoteli de la circulació intestinal i renal, seguida de coagulació localitzada amb dipòsit plaquetari subsegüent. L'anèmia hemolítica microangiopàtica es produeix per lesió mecànica dels eritròcits quan passen per l'endoteli vascular alterat. La trombocitopènia és conseqüència de l'adherència i el dipòsit plaquetari. A més del budell i del ronyó, l'afectació dels quals comporta l'enteritis i la síndrome hemolíticourèmica, també pot estar afectada la microcirculació d'òrgans com el sistema nerviós central i d'altres, i dona un ampli ventall de manifestacions.

La letalitat és d'un 3 % a un 10 %, i la persistència de seqüeles és del voltant del 5 % (288).

El nivell de gravetat del procés és molt variable. Hi pot aparèixer pal·lidesa, debilitat, letargia, irritabilitat, oligúria, edema i hipertensió. Es poden produir convulsions. La trombopènia pot ser asimptomàtica o pot produir petèquies o púrpura. També hi poden coexistir dolor abdominal, vòmits, febre i destret respiratori. L'exploració física pot revelar la presència de pal·lidesa, edema, petèquies, hepatoesplenomegàlia i irritabilitat. Es recomana fer hemogrames que incloguin l'estudi de la morfologia eritrocitària i el recompte de plaquetes, l'estudi de la funció renal i de la dehidrogenasa làctica.

Les anàlisis de l'orina posen de manifest una hematúria microscòpica, proteïnúria i la presència de cilindres. La velocitat de sedimentació globular, els ions, les proves hepàtiques i el temps de protrombina són normals.

La leucocitosi, la gravetat de l'enteritis, l'aparició precoç d'insuficiència renal i l'edat menor de dos anys són indicadors de la gravetat de la síndrome. Per seguir l'evolució d'aquests malalts es recomana durant la fase aguda sol·licitar sovint l'anàlisi esmentada anteriorment.

#### **4.2.4 Púrpura trombòtica trombocitopènica**

La púrpura trombòtica trombocitopènica és, des del punt de vista de l'anatomia patològica, idèntica a la síndrome hemoliticourèmica; es tracta d'una trombosi microangiopàtica que a més d'afectar el ronyó afecta el sistema nerviós central donant símptomes neurològics com irritabilitat, letargia o convulsions. Aquest procés, a diferència de la síndrome hemoliticourèmica, és més freqüent en els adults.

## 5. Diagnòstic microbiològic

El diagnòstic de les infeccions per *E. coli* verotoxígena en l'home o els animals es pot fer aïllant el microorganisme per cultiu o bé detectant la toxina o els seus gens directament a la femta.

L'aïllament per cultiu d'*E. coli* O157:H7 està facilitat pel fet que les soques d'aquest serotip tenen característiques metabòliques particulars, diferents de la resta de soques d'*E. coli* (*E. coli* O157:H7 és  $\beta$ -glucuronidasa i sorbitol negatius). Això ha permès dissenyar medis diferencials en els quals les colònies d'aquest serotip presenten característiques fàcilment detectables. Al contrari, la resta de serotips verotoxigènics (O26, O111, etc.) no presenten aquestes característiques diferencials i per tant, en els medis de cultiu formen colònies indiferenciables de la resta d'*E. coli*.

A més, quan s'aïlla una soca d'*E. coli* O157:H7 o bé d'O157:H típica, sorbitol i  $\beta$ -glucuronidasa negatives, inicialment no cal determinar la producció de toxina perquè pràcticament totes les soques amb aquestes característiques són productores de verotoxina. A Alemanya s'ha detectat una soca endèmica que és O157:H<sup>-</sup> sorbitol i  $\beta$ -glucuronidasa positives però productora de VT (289). Per contra, quan s'aïllen soques d'altres serotips cal detectar que siguin productores de verotoxina.

Alternativament al cultiu, es pot detectar la presència de verotoxines per proves biològiques sobre la línia cel·lular Vero, per proves immunològiques, i també se'n poden detectar els gens per PCR directament a la femta o després d'un breu enriquiment en un medi líquid.

Les mostres de femta per a estudi microbiològic s'han de recollir en un recipient hermètic petit, en un volum de 5-10 mL si són líquides, o d'una nou si són pastoses, i portar-les ràpidament al laboratori, on es processaran immediatament (en menys de dues hores), o alternativament es repartiran i es conservaran de forma adequada per a l'estudi bacteriològic, parasitològic i virològic.

En els brots de toxiinfeccions alimentàries, que s'han de declarar amb urgència a les autoritats sanitàries, la presa de mostres d'aliments és preferible que la prenguin els especialistes en Salut Pública, però si es demora la recollida, es recomana conservar els possibles aliments implicats a la nevera a 4 °C fins al seu processament. Cal recollir tot aquell aliment que sigui sospitós d'estar implicat en el brot d'acord amb la taxa d'atac específica o amb altres dades epidemiològiques o del procés de manipulació durant l'elaboració. És recomanable recollir mostres, si n'hi ha, de tots els menús consumits fins a 72 hores abans de començar el procés.

Cal tenir en compte que les matèries primeres i els ingredients poden ser la primera font de contaminació, per la qual cosa s'haurien de recollir mostres d'aquests productes sempre que sigui possible.

La recollida i conservació de les mostres s'ha de realitzar segons les recomanacions exposades en la taula 10.

## 5.1 Diagnòstic d'*E. coli* O157:H7

L'emergència d'*E. coli* O157:H7 com a patògen important tant pel que fa a casos esporàdics com a brots epidèmics d'enteritis ha portat a desenvolupar nous medis de cultiu i diferents procediments que facilitin la detecció d'aquest microorganisme.

### 5.1.1 Tècniques de cultiu i identificació

#### *Cultiu directe*

El cultiu de la femta per a l'aïllament de bacteris enteropatògens es fonamenta en la utilització de medis selectius i diferencials, els quals permeten aïllar i detectar d'una manera senzilla aquests patògens d'entre l'abundantíssima flora acompanyant que hi ha al tub digestiu, atesa la incapacitat de fermentar el sorbitol (84, 290) i la deficiència en l'enzim  $\beta$ -glucuronidasa (290, 291). Emprant aquestes dues característiques de cultiu s'han desenvolupat diferents medis per millorar el diagnòstic.

#### *Medis d'aïllament*

L'agar MacConkey (MAC) és el medi diferencial i selectiu clàssic per a bacils gramnegatius; la seva selectivitat és deguda a la presència de sals bilials i cristall violeta, que inhibeixen el creixement de la flora grampositiva. La presència de lactosa com a element diferencial és de gran utilitat per a l'aïllament en la femta dels bacteris enteropatògens, ja que la immensa majoria (salmonel·la, shigel·la, yersínia) es presenten com a colònies incolores en aquest medi, a diferència dels coliformes que fermenten la lactosa i donen lloc a colònies vermelles. Les soques d'*E. coli* O157:H7 fermenten la lactosa de manera que les seves colònies no es distingeixen de les d'altres *E. coli*.

La incapacitat d'*E. coli* O157:H7 per fermentar el sorbitol va permetre dissenyar el primer medi selectiu i diferencial per a les soques d'aquest serotip: l'agar MacConkey amb sorbitol (MAC-S), que presenta una fórmula idèntica a l'agar MacConkey llevat que la lactosa ha estat substituïda per sorbitol a l'1 % (292). *E. coli* O157 dona en aquest medi unes colònies incolores, a diferència de la resta de soques d'*E. coli*, que donen colònies de color vermell. Un inconvenient important d'aquest medi és que la lectura s'ha de realitzar a les primeres 24 hores d'incubació, ja que amb el temps

**Taula 10. Presa de mostres**

<b>Universal (bacteriologia/parasitologia/virologia)</b>	<b>Aliments</b>
<b>Volum</b> Femta sòlida: 4-6 grams (mida d'una nou) Femta líquida: 5-10 mL	<b>Volum</b> 250 grams de cada aliment com a mínim
<b>Recipient</b> De plàstic, net i tancat hermètica- ment (no escovilló)	<b>Recipient</b> De plàstic, sense medi de transport
<b>Transport</b> Ràpid, menys de dues hores des de l'emissió	<b>Transport</b> Ràpid i processament abans de 24 hores
<b>Conservació</b> Refrigeració a 4-6 °C. Els congelats a temperatura de congelació.	<b>Conservació</b> Refrigeració a 4-6 °C. Els congelats a temperatura de congelació.
<b>Específic per a bacteriologia</b>	<b>Aigua</b>
<b>Volum</b> Femta sòlida: 1-2 grams (mida d'una nou) Femta líquida: 3-5 mL	<b>Volum</b> 1.000 mL
<b>Recipient</b> De plàstic amb medi de transport tipus Cary-Blair modificat	<b>Recipient</b> Vidre o plàstic estèril
<b>Conservació</b> Temperatura ambient (si està en medi de transport)	<b>Transport</b> Ràpid
	<b>Conservació</b> Refrigeració a 4-6 °C.

les colònies sorbitol positives perden la seva coloració vermella i apareixen més tardanament com a falsament sorbitol negatives. El medi presenta una bona sensibilitat, però la seva especificitat està limitada pel fet que altres bacteris com proteus, aeromonas i alguns serotips d'*E. coli*, trobats amb relativa freqüència en mostres fecals, no fermenten el sorbitol i per tant creixen en el medi donant unes colònies d'aparença similar a les de l'O157:H7.

S'han realitzat diferents modificacions en l'agar MacConkey amb sorbitol mitjançant l'addició de diverses substàncies selectives que incrementen l'especificitat per a *E. coli* O157:H7 reduint o inhibint el creixement d'altres bacteris. Així, s'ha utilitzat la cefixima, una cefalosporina de tercera generació que inhibeix el creixement dels proteus a concentracions no inhibidores per a *E. coli*; el tel·lurit, el qual no inhibeix *E. coli* O157:H7 però sí altres serotips d'*E. coli*, i la ramnosa, la qual és fermentada per la gran majoria de soques d'*E. coli* però no per les del serotip O157:H7.

Tenint en compte aquestes característiques, s'han dissenyat diversos medis com l'agar MacConkey amb sorbitol amb cefixima i tel-lurit (MAC-S-CT), que és l'agar MacConkey amb sorbitol suplementat amb cefixima i tel-lurit potàssic (293). Aquest medi aconsegueix una important supressió del creixement de les soques d'*E. coli* no O157, així com la inhibició de les soques d'altres bacils gramnegatius, sense que en quedi afectat el creixement d'*E. coli* O157:H7, tant pel que fa al nombre de colònies com a les seves dimensions.

L'agar MacConkey amb sorbitol, ramnosa i cefixima (MAC-S-CR) és l'agar MacConkey amb sorbitol suplementat amb ramnosa i cefixima (294). L'addició de la ramnosa a l'agar MacConkey amb sorbitol permet obtenir un medi una mica més diferencial. Les soques d'*E. coli* no O157:H7 que són sorbitol negatives, i que per tant no es diferencien de les del serotip O157:H7 en el MAC-S, són majoritàriament fermentadores de la ramnosa, i creixen en aquest medi com a colònies rosades, mentre que les soques de O:157:H7, en no fermentar el sorbitol ni la ramnosa, resten incolores.

### **Medis fluorogènics i cromogènics**

Un altre caràcter bioquímic que permet diferenciar les soques d'*E. coli* O157:H7 de la resta de soques d'*E. coli* és la seva incapacitat de produir  $\beta$ -D-glucuronidasa (290). L'esmentat enzim pot ser detectat fluorogènica-ment mitjançant el substrat 4-metil umbeliferil- $\beta$ -D-glucurònid (MUG). Quan el substrat es trenca per l'acció de la  $\beta$ -D-glucuronidasa es forma 4-metilumbeliferona, un producte fluorescent detectable amb llum ultraviolada (295): també es pot detectar colorimètricament en plaques amb medis selectius suplementats amb 5-brom-6-clor-3-indolil- $\beta$ -D-glucurònid (BCIG), la hidròlisi d'aquest substrat per acció de la  $\beta$ -D-glucuronidasa dóna lloc a un canvi de color visible directament (291).

Hi ha diferents medis en el mercat que inclouen aquests substrats cromogènics i d'altres, i que tenen més o menys poder selectiu en funció de la seva formulació. A continuació es descriuen breument els més emprats per al diagnòstic d'*E. coli* verotoxigena.

- O157:H7 ID®. Aquest medi, selectiu per l'acció de les sals biliars, conté dos substrats cromogènics, un per detectar la  $\beta$ -D-glucuronidasa i un altre per detectar  $\beta$ -D galactosidasa. La diferenciació entre *E. coli* O157:H7 i altres serotips i espècies d'enterobacteris es basa en la detecció d'aquestes activitats enzimàtiques. Les colònies d'*E. coli* O157:H7, que són  $\beta$ -galactosidasa positiva i  $\beta$ -glucuronidasa negativa, es mostren de color blau-verd, mentre que les colònies de la resta de bacils gramnegatius que poden créixer en el medi es mostraran de diferents colors segons l'expressió de les diferents activitats enzimàtiques.

- Rainbow® agar O157. És un medi selectiu per a *E. coli* que conté substrats cromogènics per a la  $\beta$ -D-glucuronidasa i  $\beta$ -D-galactosidasa. Les colònies d'*E. coli* O157:H7 apareixen en aquest medi de color negre o gris, mentre que la resta de soques d'*E. coli* tenen un color rosat.
- Agar MacConkey amb sorbitol i BCIG. La capacitat diferencial de l'agar MacConkey amb sorbitol es veu incrementada per l'addició al medi de 5-brom-4-clor-3-indolil- $\beta$ -D-glucurònid (BCIG) com a substrat cromogènic per a la  $\beta$ -D-glucuronidasa. Les soques d'*E. coli* O157 no fermentadores del sorbitol i  $\beta$ -D-glucuronidasa negativa es presenten d'un color groc palla; per contra, els microorganismes amb activitat  $\beta$ -glucuronidasa trencaran el substrat i donaran lloc a colònies de color blau-verd.

Per tal d'incrementar la selectivitat de tots aquests medis cromogènics s'hi pot afegir cefixima i tel·lurit en concentracions semblants a les utilitzades al MAC-S-CT.

### **Tècniques d'enriquiment**

El cultiu directe de la femta en medis selectius és adequat en les infeccions agudes estudiades precoçment, ja que en aquest període l'excreció dels microorganismes sol ser elevada, però en estadis més tardans o durant la convalescència, així com en infectats asimptomàtics i en portadors, les mostres contenen un nombre escàs de microorganismes, de manera que es fa necessària la utilització de tècniques d'enriquiment. La taxa de recuperació d'*E. coli* O157:H7 en medis com l'agar MacConkey amb sorbitol es pot incrementar mitjançant el cultiu previ de la mostra de femta en medis líquids d'enriquiment o amb la utilització de tècniques de concentració immunomagnètica (296-298).

### **Medis d'enriquiment**

Hi ha un gran nombre de medis descrits en la bibliografia per enriquir *E. coli* verotoxigèna, sobretot en aliments. Entre aquests medis es troben el brou per a gramnegatius (GN de Hajna), el brou triptona de soja modificat amb novobiocina o amb cefixima i vancomicina, el brou triptona de soja amb cefixima, vancomicina i tel·lurit i l'aigua peptonada amb vancomicina, cefixima i cefsulodina entre d'altres. (299).

### **Separació immunomagnètica**

Aquesta tècnica, també anomenada d'immunocaptura, és un sistema de concentració previ al cultiu en medis selectius sòlids. És una tècnica dissenyada per incrementar la recuperació d'*E. coli* O157:H7 verotoxigèna dels aliments, encara que també s'aplica per detectar aquest microorganisme en la femta (300).

La tècnica es fonamenta en l'ús de petites esferes paramagnètiques recobertes amb anticossos anti-O157 (anti-*E. coli* O157 Dynabeads®; Dynal) que



s'incorporen al brou d'enriquiment al qual s'ha sembrat la mostra de femta. Si a la mostra hi ha *E. coli* O157 el microorganisme és capturat pels anticossos units a les esferes magnètiques, i posteriorment el complex microbi-anticos-esfera es concentra mitjançant l'aplicació d'un camp magnètic.

Així doncs, el sediment, que conté els bacteris fixats a les partícules magnètiques, es torna a sembrar en un medi selectiu com ara l'agar MacConkey amb sorbitol (MAC-S) i l'agar MacConkey amb sorbitol amb tel·lurit i cefixima (MAC-S-CT), després de realitzar diferents rentats amb la finalitat d'eliminar les restes fecals i els diferents bacteris acompanyants que poguessin interferir en la prova.

Per al processament de la femta es recomana un període curt de preenriquiment, d'unes sis a vuit hores, cultivant la femta en qualsevol dels brous descrits anteriorment, com ara el brou GN de Hajna o els medis suplementats amb antibiòtics, seguit de la incubació amb el reactiu Dynabeads® i posterior separació magnètica.

Karch *et al.*, com altres autors (299-302) que entren aquest sistema, conclouen que la tècnica de separació immunomagnètica és una tècnica alta-ment sensible que permet detectar de l'ordre de  $10^2$  ufc per gram de femta o aliments en presència de  $10^7$  bacteris coliformes acompanyants, de manera que se supera en sensibilitat la PCR, la qual requereix concentracions d'*E. coli* O157:H7 aproximadament de l'ordre de  $10^5$  ufc per gram de femta per a obtenir un resultat positiu. Així doncs, l'enriquiment de la mostra seguida de la separació immunomagnètica i del cultiu en medis diferencials i selectius incrementa de forma important la sensibilitat de les proves específiques de detecció d'*E. coli* O157:H7.

Aquesta tècnica és específica per al serogrup O157, per tant dintre d'aquest serogrup pot detectar altres serotips a part de l'H7; ben al contrari, no es detecten soques d'*E. coli* verotoxígenes que pertanyen a altres serogrups.

### **Identificació bioquímica i serològica**

Tota colònia que presenta les característiques d'*E. coli* O157:H7 segons el medi diferencial selectiu utilitzat per al seu aïllament es tornarà a sembrar en una petita bateria de cribratge per a enteropatògens, com la formada pels medis agar de Kligler (KIA), agar amb lisina-ferro (LIA), i un tub d'aigua peptonada per detectar l'indole. Després d'una incubació de divuit hores a 37 °C, en tota soca metabòlicament compatible amb *E. coli* (glucosa<sup>+</sup>, SH<sub>2</sub><sup>-</sup>, lactosa<sup>+/-</sup>, lisina decarboxilasa<sup>+</sup>, indole<sup>+</sup>) s'estudiarà la presència de la β-glucuronidasa i es confirmarà la incapacitat de la fermentació del sorbitol en un medi estàndard (303).

### **Detecció de l'activitat β-glucuronidasa**

Per detectar o confirmar l'absència de l'activitat β-glucuronidasa s'utilitza una solució d'un substrat cromogènic incolor com l'àcid p-nitrofenil-β-D-glu-

copiranosidurònic (PNPG) (303), que quan és hidrolitzat per l'enzim s'allibera p-nitrofenol, el qual presenta un color groc i en cas negatiu roman incolor. La lectura s'efectua quatre hores després de la incubació.

Si la colònia d'*E. coli* és  $\beta$ -glucuronidasa i sorbitol negativa es pot aglutinar amb els antisèrums específics.

### **Identificació serològica d'*E. coli* O157:H7**

Les soques sorbitol i  $\beta$ -glucuronidasa negatives s'aglutinen amb els antisèrums O157 i H7 per determinar-ne el serotip. L'aglutinació es farà preferentment a partir de colònies llises d'un cultiu de divuit hores en el medi de Kligler o d'agar amb sang.

De tota manera, entre el 3 % i el 10 % de les soques del serogrup O157 són variants immòbils que produeixen Stx. Com que també s'aïllen altres soques O157 amb altres antígens H diferents de l'H7, és molt important determinar si la soca és sorbitol i  $\beta$ -glucuronidasa negativa ja que en aquest cas es tracta molt probablement d'una soca productora de verotoxina. Per contra, si és O157 però no aglutina amb l'anti-H7, i és sorbitol i/o  $\beta$ -glucuronidasa positius es pot tractar d'una soca d'un altre serotip no verotoxigènic o de la variant alemanya, H<sup>-</sup>, sorbitol<sup>+</sup>,  $\beta$ -glucuronidasa<sup>+</sup>, Stx2<sup>+</sup>. Aquest bioserotip s'ha aïllat també a la República Txeca. Totes aquestes soques semblen molt sensibles al tel·lurit (141, 304). La determinació serològica de l'antigen H7 pot presentar dificultats, i pot ser que en moltes ocasions calgui mobilitzar les soques per passes en un medi d'agar tou com el de Sven-Gard (305).

S'han comercialitzat reactius de làtex recoberts d'anticossos per a l'aglutinació d'O157 i H7 que faciliten la lectura. Després de comparar aquests reactius amb els estàndard, s'ha trobat que presentaven una sensibilitat del 100 % i el 97 % per a l'O157 i l'H7 respectivament, i una especificitat del 100 % per a ambdós reactius (32).

### **Identificació definitiva d'*E. coli* O157:H7**

Les soques identificades presumptivament com a *E. coli* O157:H7 s'hauran de sotmetre a una identificació metabòlica definitiva mitjançant la utilització de tècniques convencionals (306).

#### **5.1.2 Detecció de la producció de toxines**

La demostració de la producció de toxines Stx1 i Stx2 per a les soques aïllades requereix estudiar-les en la línia cel·lular Vero o mitjançant proves immunològiques o genètiques.

Qualsevol de les tècniques que detecten les toxines es poden utilitzar per identificar les soques verotoxígenes tant si pertanyen al serotip O157:H7 com a altres serotips.

### **Tècniques biològiques. Detecció de la producció de verotoxines en cultiu cel·lular**

La detecció de verotoxina en el sobrenedant d'un cultiu d'*E. coli* mitjançant tècniques de cultiu cel·lular és el mètode considerat de referència i s'empra la línia Vero (ATCC CCL 81), segons mètodes descrits (14).

La tècnica consisteix a cultivar les soques en brou de triptona de soja, del qual s'inocula el sobrenedant, a diferents dilucions, prèviament filtrat en micropouets que contenen les cèl·lules. S'incuben a 37 °C i s'examinen en el microscopi invertit les monocapes cel·lulars després de 4, 24, 48 i 72 hores per detectar l'acció citotòxica, caracteritzada per alteracions de la morfologia cel·lular que s'iniciïn amb l'arrodoniment de les cèl·lules, que adquireixen una aparença més refringent per, posteriorment, separar-se de la superfície del cultiu i finalment alliberar-se al medi. L'especificitat de l'acció s'ha de controlar amb la neutralització de l'acció tòxica amb antisèrums específics. Aquesta és una tècnica de referència extraordinàriament laboriosa i cara que només s'utilitza en treballs d'investigació i no en el diagnòstic convencional.

### **Tècniques immunològiques. Detecció de Stx1 i Stx2 per enzimimmunoassaig**

S'han desenvolupat nombrosos assaigs immunològics (ELISA) per a la detecció directa de les verotoxines Stx1 i Stx2, encara que no n'hi ha gaires de comercialitzats.

Aquests reactius són també útils per determinar la presència de verotoxines en una mostra fecal, en el sobrenedant d'un cultiu de la femta o aliments, o en el cultiu en medi líquid d'una soca prèviament aïllada. El sistema Premier® EHEC (307) és una ELISA de captura constituïda per pouets de plàstic als quals s'ha fixat una barreja de dos anticossos monoclonals o policlonals purificats dirigits cap a Stx1 i Stx2. Les toxines, si n'hi ha a la femta (o als cultius), les fixaran aquests anticossos i es revelaran mitjançant uns segons anticossos antitoxina, contra els quals es dirigiran uns tercers anticossos marcats amb un enzim, generalment peroxidasa de rave picant. En alguns sistemes els segons anticossos dirigits contra les toxines ja estan directament marcats per l'enzim. L'enzim (peroxidasa) actua sobre l'aigua oxigenada alliberant oxigen que oxida un substrat ( $\alpha$ -fenilendiamina) que canvia de color.

### **Detecció de Stx1 i Stx2 per aglutinació facilitada (làtex)**

Aquestes tècniques utilitzen partícules de làtex sensibilitzades amb anticossos anti-Stx1 i anti-Stx2, que en reaccionar amb les toxines alliberades pel bacteri aglutinaran i donaran lloc a una reacció positiva fàcilment observable. Hi ha reactius comercialitzats, com el VTEC-RPLA® (308). L'estu-

di de la verotoxina es pot realitzar a partir d'un cultiu d'*E. coli* en medi líquid o d'una suspensió practicada a partir d'un cultiu en medi sòlid, com l'agar d'infusió de cervell i cor, prèvia extracció en ambdós casos de la toxina amb polimixina B. Aquest mètode, que permet detectar les toxines en els cultius de soques aïllades, no sembla útil per a la detecció directa de la toxina a la femta (309).

### **Tècniques serològiques**

S'han desenvolupat tècniques serològiques per detectar anticossos contra les verotoxines en el sèrum dels malalts amb síndrome hemolíticourèmica. El seu principal inconvenient rau en el fet que només tenen valor retrospectiu i no permeten establir un diagnòstic precoç, ja que s'han d'estudiar dos sèrums, un de precoç i un altre de la convalescència, simultàniament. No obstant això, de vegades són l'única evidència de la infecció per soques verotoxígenes en aquests pacients. També es poden utilitzar per conèixer la prevalença de la infecció en una determinada població.

### **Estudi dels gens codificadors de *Stx1* i *Stx2* mitjançant PCR**

Un mètode alternatiu a la detecció immunològica de les toxines consisteix en la detecció dels gens *stx1* i *stx2* mitjançant la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) (310, 311).

Es practica una suspensió d'una colònia del bacteri, se n'extreu el DNA i posteriorment es desnaturalitza. L'amplificació es realitza segons les tècniques convencionals amb la utilització d'iniciadors adequats (309, 311, 312-314). Es visualitzarà una part alíquota de cada amplificat mitjançant electroforesi en gel d'agarosa i tinció amb bromur d'etidi. La confirmació precisa de l'especificitat dels amplicons requereix la utilització de sondes específiques per Southern Blot o Dot Blot (315-317).

La detecció de les variants de *Stx2* es pot fer estudiant el perfil dels fragments de restricció d'un amplicó específic de la toxina obtingut per PCR (318-320).

La detecció dels gens *stx1* o *stx2* no implica necessàriament l'expressió fenotípica de les toxines, encara que a la pràctica una soca positiva es pot considerar com a productora de la toxina.

La PCR presenta una sensibilitat subòptima quan s'utilitza directament amb extractes fecals (321) i també d'aliments (322), probablement per la presència d'inhibidors de la polimerasa. La sensibilitat s'incrementa molt quan es realitza a partir de cultius de femta o aliments en medi líquid d'enriquiment, que es poden incubar durant curts períodes de temps al voltant de sis hores (313, 322, 323). La tècnica és òptima quan s'aplica a cultius purs de bacteris per determinar si són toxigènics.

### 5.1.3 Detecció d'altres factors de virulència

Les toxines Stx1 i Stx2 són els principals factors de virulència associats amb la colitis hemorràgica i la síndrome hemolíticourèmica, però *E. coli* enterohemorràgica produeix altres factors de virulència accessoris, entre els quals es troben la intimina (*eae*) i l'enterohemolisina (*ehxA*), descrits en primer lloc en soques toxigèniques d'*E. coli* O157:H7 i posteriorment en altres serotips verotoxigènics. La detecció d'aquests factors de virulència, en particular l'*eae* en una soca verotoxígena, dóna suport a la hipòtesi de la seva capacitat enteropatògena per a l'home.

Les sondes i la PCR són els dos mètodes més utilitzats per detectar gens associats a la virulència en les soques d'*E. coli*. S'han avaluat diferents gens, incloent-hi el gen *eae* (324, 325), el gen de la  $\beta$ -glucuronidasa *uidA*, així com el gen *fliCh<sub>7</sub>* que codifica per l'antigen H7 (326), fragments del plàsmid de 90 kb (140) i el gen de l'hemolisina (*ehxA*) (131) per tal de desenvolupar mètodes de detecció de diferents factors presents en *E. coli* enterohemorràgica.

Alguns d'aquests gens es poden detectar simultàniament per una PCR amb diversos iniciadors (multiplex PCR) (326-329).

#### **Enterohemolisina: detecció per cultiu**

Al voltant del 80 % al 90 % de les soques d'*E. coli* verotoxigenes de diversos serotips aïllades d'humans presenten un fenotip d'enterohemolisina típic i diferent de l' $\alpha$ -hemolisina, que pot ser utilitzat com un marcador presumptiu per a la selecció de soques d'*E. coli* potencialment productores de verotoxines (308).

Aquest mètode descrit per Beutin *et al.* (308) consisteix en el cultiu de les soques d'*E. coli* en plaques d'agar amb sang convencional i en plaques d'agar amb sang preparades amb sang desfibrinada de be al 5 %, rentada tres vegades amb tampó fosfat, pH 7,2 i suplementada amb CaCl<sub>2</sub> 10 mM.

La producció de  $\alpha$ -hemolisina és visible en els dos tipus d'agar amb sang a les quatre hores d'incubació, mentre que la producció d'enterohemolisina només s'observa en les plaques d'agar amb sang preparades amb eritròcits rentats. Després de 24 hores d'incubació s'observen unes zones d'hemòlisi molt més petites que les produïdes per l' $\alpha$ -hemolisina.

La producció d'enterohemolisina és un marcador prou útil per fer un cribratge de les soques potencialment verotoxigenes independentment del seu serotip (130, 330). No cal oblidar, però, que al voltant d'un 20 % de soques verotoxigenes d'altres serotips diferents del O157:H7 no produeixen enterohemolisina.

Aquest medi de cultiu es pot utilitzar per sembrar la femta, prèviament incubada en brou de triptona de soja durant divuit hores amb la intenció de

detectar les colònies productores d'enterohemolisina (331). Les colònies enterohemolítiques posteriorment es confirmaran com a *E. coli* verotoxígena per mètodes convencionals. Desconeixem, però, la sensibilitat i l'especificitat d'aquest mètode.

### **Detecció del gen de l'enterohemolisina (ehxA)**

El gen *ehx* de l'enterohemolisina està localitzat en el plasmidi associat a virulència de 90 kb, que es troba a la majoria de soques d'*E. coli* verotoxígena que produeixen infecció humana (131). Sembla que aquest gen està estretament relacionat amb *E. coli* enterohemorràgica i amb la gravetat de la malaltia, encara que no hi ha unanimitat respecte a això.

### **Detecció del gen *eae* mitjançant PCR**

L'extracció del DNA de les soques bacterianes s'ha de dur a terme a partir d'extractes crus emprant un mètode similar al de la detecció de les verotoxines, i cal emprar per a l'amplificació iniciadors descrits prèviament (332). L'especificitat dels amplicons es pot confirmar per sondes específiques.

## **5.2 Protocols de diagnòstic microbiològic d'*E. coli* verotoxígena**

L'estudi sistemàtic d'aquests microorganismes en el laboratori de microbiologia clínica depèn de la seva freqüència a la zona. Quan la freqüència és molt baixa s'hauria d'estudiar només en les diarrees amb sang i en la síndrome hemolíticourèmica. D'altra banda, també s'ha d'estudiar en els brots de toxiinfecció alimentària compatibles amb aquesta etiologia.

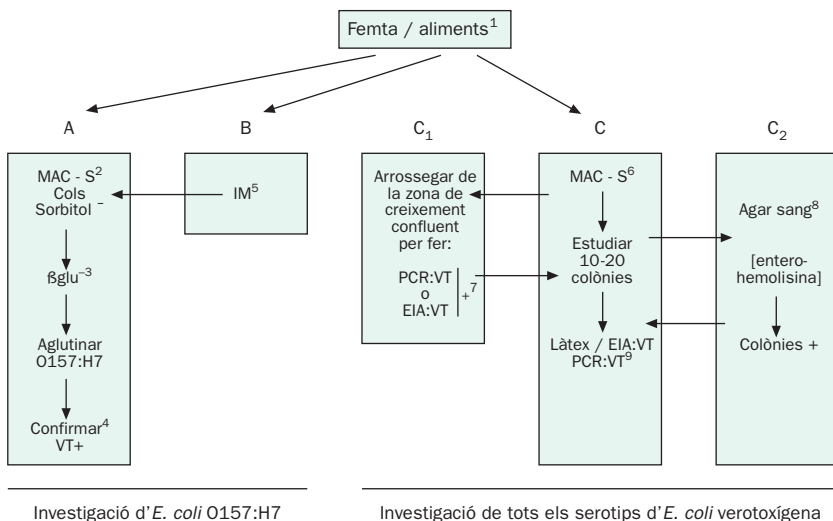
Les tècniques que cal utilitzar depenen de l'experiència de cada laboratori en els diferents medis de cultiu i procediments d'identificació. De tota manera, tots els reactius i els medis de cultiu han de ser sotmesos a un control de qualitat molt rigorós, sobretot els que porten tel·lurit o altres antimicrobians.

L'esquema representat a la figura 13 té caràcter orientatiu; altres protocols poden ser igualment útils.

### **5.2.1 Protocol per a *E. coli* O157:H7**

El protocol mínim, assenyalat a la figura 13 A, requereix sembrar directament la femta en un medi selectiu i diferencial. És recomanable utilitzar un medi sense antibiòtics com el MAC-S o un medi cromogènic i d'altre de més selectiu com el MAC-S amb tel·lurit i cefixima, o amb altres antibiòtics. A les colònies sorbitol negatives aïllades dels medis amb aquest sucre se'ls estudiarà la  $\beta$ -D-glucuronidasa, i si és negativa s'aglutinaran amb els antisèrums O157 i H7. Les colònies  $\beta$ -D-glucuronidasa negatives aïllades dels medis cromogènics també s'aglutinaran directament, i en cas positiu s'estudiarà la fermentació del sorbitol en medis convencionals.

**Figura 13. Protocol d'investigació d'*E. coli* verotoxigena**



A i B: estudi d'*E. coli* O157:H7.

A: protocol mínim.

C: estudi de tots els *E. coli* verotoxígena.

C<sub>1</sub> i C<sub>2</sub> poden completar el protocol C.

1. S'han de sembrar 25 g d'aliments en 250 mL de brou amb novobiocina, cal incubar-ho durant 6-18 hores i seguir els protocols a partir d'aquest cultiu.
2. És recomanable utilitzar dos medis, un de poc selectiu, com el MAC-S o un de cromogènic (vegeu el text principal), i un altre de més selectiu com el MAC-S-CT.
3. La β-glucuronidasa es pot detectar per una tècnica ràpida (vegeu el text principal). Si s'utilitza un medi cromogènic que detecta la β-glucuronidasa, s'aglutinen les colònies β-glucuronidasa negativa.
4. Confirmar per tècniques immunològiques o per PCR. Alternativament, remetre a un centre especialitzat.
5. Encara que aquesta tècnica de concentració és molt útil; si no se'n disposa, pot enriquir-se per altres mètodes com ara la sembra en brou amb cefixima i tel-lurit o brou amb vancomicina, cefixima i cefsulodin.
6. És recomanable utilitzar agar MacConkey convencional amb lactosa o agar MacConkey amb sorbitol, del qual s'estudiaran colònies sorbitol positives i negatives i MAC-S-CT per a O157:H7.
7. Alguns autors recomanen estudiar les colònies individualitzades en nombre significatiu (de 10 a 20), només si ha estat positiva la detecció de VT per EIA o PCR, feta de l'arrossegat del creixement confluent de la placa d'aïllament.
8. Alguns autors recomanen estudiar per làtex, EIA o PCR només les colònies que són enterohemolisina positiva en la placa d'agar sang (vegeu el text principal).
9. Si no es disposa d'aquestes tècniques cal enviar-ho a un centre especialitzat.

βglu: β-glucuronidasa.

IM: concentració immunomagnètica (Dynabeds) (vegeu el text principal).

MAC-S: MacConkey sorbitol.

Làtex/EIA:VT: detecció de VT de les soques aïllades per tècniques de làtex o enzimoimmunoanàlisi.

PCR:VT: PCR per a la detecció dels gens de la verotoxina.

Quan es detecta una soca d'*E. coli* O157:H7 (o O157:H), sorbitol i  $\beta$ -glucuronidasa negativa es pot assumir (en més del 95 % dels casos) que és productora de verotoxina, i cal donar el resultat i remetre-la a un centre especialitzat per estudiar la producció de verotoxina.

La concentració per tècnica immunomagnètica s'ha recomanat en aliments, però també es útil per al diagnòstic de la infecció en l'home; el cost i la laboriositat en fa una tècnica que té unes indicacions precises. Es pot utilitzar en els brots i quan la sospita clínica és molt elevada. Alternativament, es pot enriquir en un medi com el brou de triptona de soja amb novobiocina, o amb cefixima, vancomicina, i cefsulodina (figura 13).

### 5.2.2 Protocol per a tots els serotips verotoxigènics

Altres serotips d'*E. coli* diferents d'O157 han estat responsables de casos esporàdics, de brots de colitis hemorràgica greu i de la síndrome hemolítico-courèmica (34, 35). Aquests serotips toxigènics d'*E. coli* semblen més prevalents que *E. coli* O157:H7 en el ramat, la carn de boví i altres productes associats a la infecció per *E. coli* enterohemorràgica i a determinades àrees geogràfiques. Per tot això sembla clara la necessitat de detectar als laboratoris les soques d'*E. coli* no O157.

El mètode de cribratge per a aquestes soques no és gens fàcil de definir perquè aquests serotips no tenen, com en el cas d'*E. coli* O157:H7, un fenotip diferenciat. La majoria d'aquestes soques fermenten el sorbitol, per la qual cosa els medis que empren aquest sucre com a element diferencial, com és el MAC-S, MAC-S-CT i MAC-S-CR, no tenen utilitat específica. Tampoc és útil la identificació presumptiva amb antisèrums en front d'antígens somàtics, ja que les soques toxigèniques d'*E. coli* pertanyen a molts serogups diferents (taula 3).

Naturalment, quan en un brot es coneix la soca implicada (O111, O26, etc.), les colònies es poden destriar aglutinant amb l'antisèrum del serotip implicat. En altres casos el procediment més utilitzat consisteix a seleccionar a l'atzar d'una placa d'agar MacConkey o agar MacConkey amb sorbitol un nombre variable de colònies compatibles amb *E. coli*, i detectar les toxines Stx, ja sigui per mètodes immunològics o per mètodes moleculars com la PCR, ja descrits anteriorment (figura 13).

Alguns experts, a fi de facilitar la selecció de les colònies que cal estudiar, suggereixen tornar a sembrar les colònies aïllades de la placa de MacConkey en una placa d'agar amb sang rentada en forma de petites estries per detectar les soques productores d'enterohemolisina. Aquesta tècnica permet fer fins a vint estries (colònies) per placa d'agar amb sang. Tant les soques toxigèniques d'*E. coli* O157:H7 com més del 80 % de les pertanyents a altres serotips produeixen l'enterohemolisina característica.



També alguns microbiòlegs recomanen insistir a estudiar un nombre important de colònies individualitzades, segons el protocol abans esmentat, quan un cultiu directe de la femta en medi líquid (brou selectiu) o bé una suspensió de la zona de creixement confluent d'una placa d'aïllament ha estat positiva per Stx, bé sigui per una tècnica immunològica o genètica (figura 13).

## 5.3 Anàlisi d'aliments. Aspectes legals

### 5.3.1 Anàlisi d'aliments

La detecció d'*E. coli* verotoxígena en els aliments, com en les mostres humanes (femtes) es pot fer per aïllament del bacteri i recerca de toxines a les soques aïllades, o bé per la detecció directa de les verotoxines o els seus gens a les mostres d'aliments.

El procediment per investigar *E. coli* verotoxígena als aliments s'ha de realitzar seguint les tècniques normalitzades i de referència proposades pels organismes internacionals per detectar microorganismes patògens causants de toxiinfecció alimentària.

La recollida de mostres d'aliments és una part important per poder determinar les fonts d'infecció o els vehicles de transmissió i d'aquesta manera poder contribuir a aplicar mesures de control i prevenció dels brots epidèmics originats per aquest bacteri.

En el cas d'un brot epidèmic és recomanable recollir mostres de tots els aliments sospitosos d'estar implicats en el brot, i si fos possible, es recolliran mostres dels aliments consumits fins a 72 hores abans del primer cas. Pel que fa als aliments, fonamentalment a aliments carnis i derivats, la quantitat de mostra que es recomana recollir és de 200-500 g o mL. Si és possible també és recomanable recollir mostres de les matèries primeres amb les quals s'han elaborat els aliments sospitosos. La quantitat de mostra per a la investigació d'*E. coli* verotoxígena en aigua serà, com a mínim, d'un litre.

El transport i la conservació de les mostres es farà a la temperatura recomanada de conservació o d'emmagatzematge, és a dir a temperatura ambient en els aliments no refrigerats, a 4 °C els aliments peribles, i els aliments congelats es mantindran congelats fins a l'examen. Les mostres d'aigua es conservaran a 4 °C. D'altra banda, el temps transcorregut des de la recollida de la mostra i la seva anàlisi no ha de superar les 24 hores. Les tècniques de detecció per cultiu d'*E. coli* verotoxígena en els aliments es farà a partir de 25 g de mostra, i en el cas de mostres d'aigua la quantitat mínima serà de 250 mL.

En els aliments sempre s'ha de fer un preenriquiment en medis líquids no selectius o lleugerament selectius. A partir d'aquest moment les mostres

es poden processar com si es tractés d'una mostra fecal, sembrant el cultiu en medi selectiu amb i sense enriquiment previ per tècniques immunomagnètiques o altres brous que continguin tel-lurit i cefixima, novobiocina (295) o acriflavina (333), o bé estudiant la verotoxina per tècniques immunològiques o PCR, com s'ha descrit prèviament.

Per als aliments s'ha descrit una tècnica d'immunocromatografia ràpida de detecció d'*E. coli* O157 amb la qual es poden obtenir resultats en uns vint minuts, aplicable després de vuit hores d'enriquiment amb brou. La limitació d'aquesta tècnica és que detecta totes les soques del serogrup O157 siguin o no H7 i, per tant, siguin o no productores de verotoxina.

En el cas d'una anàlisi de grans volums d'aigües les mostres es poden concentrar mitjançant mètodes de filtració.

### 5.3.2 Aspectes legals

Les normes microbiològiques establertes per als aliments i les aigües tendeixen a fixar límits per a gèrmens indicadors o gèrmens testimonis de falta d'higiene, així com indicacions genèriques d'absència de microorganismes patògens, com seria el cas de l'*E. coli* O157:H7. En tot cas els resultats de les anàlisis han de complir les normatives comunitàries estatals o autonòmiques que es publiquen als corresponents diaris oficials.

Tot i que les normes no ho preveuen explícitament, cal tenir en compte el perill de contaminació per aquest microorganisme en aquells establiments on es manipulin aliments de risc com carns i preparats de carn dins el Programa d'anàlisi de perills i punts crítics de control (APPCC).

## 5.4 Anàlisi epidemiològica. Tècniques de laboratori

### 5.4.1 Biotipat

Encara que el biotipat és un mètode útil per a la divisió infraespecífica d'*E. coli*, la capacitat discriminativa dins del serotip O157:H7 és petita. No coixem el valor d'aquest mètode per tipar soques d'altres serotips.

### 5.4.2 Fagotipat

El primer sistema de fagotipat per a *E. coli* O157 de catorze fagotips es va dissenyar el 1987 (334), però el 1990 es va ampliar per al grup de Lior a 62 fagotips (335) i recentment s'ha estès a 82 fagotips.

Una altra dificultat de l'ús únic del fagotipat com a mètode de classificació infraespecífica és que en algunes àrees predomina tant un determinat fagotip que no permet la discriminació. Això passa amb el fagotip 2 a Anglaterra, que es detecta en el 46 % de les soques estudiades al laboratori, i on el 84 % de les soques pertanyen a cinc fagotips (196). Una situació similar es produeix a Canadà amb el fagotip 14 (336).

Quan es detecta un fagotip rar en un brot no cal complementar amb tècniques addicionals, però en cas contrari sí que cal fer-ho amb tècniques més discriminants (65, 337, 338).

### 5.4.3 Genotipat

Per al genotipat d'*E. coli* O157:H7 s'han utilitzat diverses tècniques entre les quals hi ha el ribotipat, que no s'ha mostrat útil en *E. coli* O157:H7 (339). Les tècniques de genotipat per amplificació a l'atzar (*ramdom amplification*, RAPD) (340, 341) ha estat utilitzades per alguns autors (342, 343), encara que la reproductibilitat d'aquesta tècnica ha estat qüestionada per altres microbiòlegs. En el tipat d'aquest microorganisme hi ha menys experiència amb tècniques com l'ERIC i l'REP.

La tècnica més utilitzada per al genotipat és l'electroforesi en camp pulsant (PFGE) (vegeu l'apartat 2.1). En referència a *E. coli* O157:H7, es pot dir que la primera aplicació de la tècnica es va publicar el 1992 (344). La capacitat de discriminació de la tècnica per aquest microorganisme ha estat objecte d'opinions diferents (272, 344, 345).

Encara que, en general, el PFGE com a tècnica de genotipat és més discriminador que el lisotipat, en alguna ocasió soques amb un mateix pulsotip han estat diferenciades pel fagotipat. En realitat, segon les dades parcials de l'estudi d'un brot s'hauran de desenvolupar estudis addicionals (65, 339).

Sembla lògic que com més clònic sigui el grup de microorganismes estudiat (i *E. coli* O157:H7 és altament clònic) (136), menor poder de discriminació tindrà el mètode i més difícil serà decidir els criteris utilitzats per avaluar els resultats d'una tècnica.

Alguns autors, per PFGE han trobat identitat total entre les soques d'un mateix brot (337). Nosaltres hem observat en un mateix brot soques idèntiques i d'altres que es diferencien en una o dues bandes, però amb més homologia entre si que amb les soques que no pertanyen al brot.

El tipat sistemàtic de les soques per PFGE ha permès detectar brots que no s'havien detectat prèviament (346) i monitoritzar la situació endemico-epidèmica d'un país (347).

## 6. Terapèutica

### 6.1 Tractament de la diarrea

Els objectius fonamentals del tractament d'una diarrea aguda són, en primer lloc, la restauració o el manteniment de l'equilibri hidroelectrolític; en segon lloc, el manteniment de l'estat de nutrició, i en tercer lloc la prevenció de la transmissió del microorganisme per evitar casos nous. Aquests objectius es poden complir administrant de forma racional els líquids i aliments adequats, controlant el malalt i prescrivint les mesures d'aïllament adients.

Quan se sospita una enteritis causada per *E. coli* enterohemorràgica és convenient demanar sempre un estudi bacteriològic de la femta i altres proves analítiques com són un hemograma amb fórmula, incloent l'estudi de la morfologia dels hematies, el recompte de les plaquetes, i les dades bioquímiques per conèixer l'equilibri hidroelectrolític i la funció renal. Des del punt de vista clínic s'ha de controlar la tensió arterial i la diuresi.

En els primers casos de diarrea produïda per *E. coli* O157:H7 els anys vuitanta, es va fer tractament mèdic amb fàrmacs antiperistaltògens i antibiòtics. Posteriorment, en observar l'evolució i la resposta als tractaments que havien estat utilitzats als diferents brots epidèmics es va concloure que no s'han de prescriure medicaments que disminueixin la mobilitat intestinal perquè incrementen l'absorció de verotoxina i el risc de desenvolupar la síndrome hemolíticourèmica. Molt probablement tampoc són recomanables els tractaments amb antibiòtics.

El pacient, generalment un nen, pot presentar uns símptomes alarmants que indueixin els pares a sol·licitar unes mesures d'efecte immediat. El nen pot tenir un dolor abdominal intens, presentar femtes amb sang, vòmits i, a vegades, quan se sap que l'agent patògen és *E. coli* O157:H7, apareix la por que es produeixi una complicació greu. Com s'ha assenyalat, però, la proposta de tractament ha d'anar dirigida a evitar la deshidratació i la desnutrició, l'anèmia greu i l'aparició de la síndrome hemolíticourèmica. També és important prevenir la transmissió del microorganisme en l'àmbit escolar o familiar (348).

#### 6.1.1 Tractament de la deshidratació

Per poder avaluar clínicament l'estat d'hidratació s'exploraran els signes i símptomes assenyalats a la taula 11. L'objectiu del tractament és corregir les pèrdues existents de líquids i electròlits, i compensar les pèrdues continuades per la diarrea i els vòmits.

**Taula 11. Signes i símptomes de deshidratació**

Caràcters avaluats	Deshidratació		
	Lleu	Moderada	Greu
Aspecte del pacient			
Lactants	Assedegat, despert, agitat	Assedegat, agitat, irritable	Diferents graus d'afectació sensorial, somnolència→coma, fred, cianòtic
Nens i adults	Assedegat, despert	Assedegat, vertígens	Conscient, fred, cianòtic
Pols radial	Normal	Ràpid i dèbil	Ràpid, dèbil o impalpable
Estat hemodinàmic			
Pressió sistòlica	Normal	Normal o baixa	Inferior a 80 mm d'Hg
Freqüència cardíaca	Normal	Taquicàrdia	Taquicàrdia
Fontanel·la anterior (lactants)	Normal	Lleugerament deprimida	Molt deprimida
Elasticitat cutània	Desaparició ràpida del plec	Desaparició lenta del plec	Desaparició molt lenta del plec
Ulls	Normal	Enfonsats	Molt enfonsats, sense llàgrimes
Mucoses	Humides	Seques	Molt seques
Excreció urinària	Normal	Oligúria	Oligúria, anúria
Pèrdua de pes corporal <sup>1</sup>	3-5%	6-9%	10% o més
Dèficit hídric estimat	40-50 mL/kg	60-90 mL/kg	100-110 mL/kg

No es té en compte el tipus de deshidratació en relació amb l'osmolaritat. Segons el sodi plasmàtic es pot considerar com a hipotònica si hi ha valors inferiors a 130 mEq/L, isotònica entre 130 i 150 mEq/L i hipertònica quan supera els 150 mEq/L.

1. La variació depèn de l'edat; en la deshidratació lleu pot ser del 5 % en el lactant i del 3 % en l'adolescent; en la moderada, del 9 % en el lactant i del 6 % en l'adolescent; i en la greu, del 15 % en el lactant i del 10 % o més en l'adolescent.

La rehidratació es farà per via oral en els casos de deshidratació lleu i moderada si la tolerància digestiva és bona. És molt important donar al nen la solució oral adequada, a l'inici de la diarrea, administrant el líquid en petites quantitats i sovint per aprofitar al màxim la funció de transport romanent. Les solucions glucoelectrolítiques es donaran a temperatura ambient. En línies generals es calcularà una aportació de 100-150 mL/kg/24 h segons les pautes assenyalades a la taula 12. Si s'utilitzen preparats comercials, el contingut de glucosa ha de ser aproximadament de 20 g/L (74-111 mmol/L), amb una concentració de sodi d'entre 40 i 60 mmol/L (taula 13).

Es controlarà l'evolució de la hidratació avaluant l'estat general, el pes, la tensió arterial i la diüresi. En el nen que és a casa és molt important el control de la diüresi.

## Taula 12. Pautes de la rehidratació

Pautes de rehidratació oral en la deshidratació isonatrièmica o hiponatrièmica

Estat	Pautes	
	Inicial	Posterior
Deshidratació lleu	50 mL/kg (durant 4 h)	100 mL/kg/24 h
Deshidratació moderada	100 mL/kg/6 h	100 mL/kg/24 h

Alguns pediatres, com Tarr, pensen que en els nens amb colitis hemorràgica s'ha d'iniciar la rehidratació per via parenteral encara que no estiguin deshidratats o la deshidratació sigui lleu. (349). En tot cas, la rehidratació es farà sempre per via endovenosa quan hi hagi una deshidratació intensa, superior al 10 %, amb una pèrdua important de líquids (més de 10 mL/kg/h); quan el malalt estigui en estat de xoc o prexoc amb desequilibris iònics importants; amb l'ili paralític, la funció renal alterada, i disminució del nivell de consciència o aspecte sèptic, deshidratacions que precisen tractament amb un sodi més baix que el que aporten les solucions de rehidratació oral; persones amb vòmits molt importants; distensió gàstrica greu, o altres complicacions greus i nens que no accepten la rehidratació oral.

## Taula 13. Composició de la solució de rehidratació oral

### Solució de rehidratació

- 40- 60 mmol/L de sodi
- 20 mmol/L de potassi
- 25-50 mmol/L de clor
- 10 mmol/L de citrat
- 74- 111 mmol/L de glucosa

Recomanada per la Societat Europea de Gastroenterologia, Hepatologia i Nutrició Pediàtrica.

### 6.1.2 Tractament dietètic

La lactància, tant la natural com la de fórmula, es pot suspendre durant unes hores, i se substitueix per les solucions de rehidratació adequades. Un cop passades les primeres quatre o sis hores, s'intentarà reintroduir l'alimentació. En estudis recents, si la diarrea no és greu, es recomana no suprimir l'alimentació normal que prenia habitualment el nen, i només si l'evolució no és favorable i se sospita una intolerància a la lactosa s'utilitzarà una fórmula sense lactosa, durant dues o tres setmanes (350).

### 6.1.3 Tractament medicamentós

En l'actualitat, com ja s'ha apuntat, el tractament de la diarrea infecciosa produïda per *E. coli* verotoxigena es basa en l'administració de les solucions de rehidratació adequades i la realimentació precoç.

Els tractaments amb fàrmacs antiperistaltògens no són efectius i estan rigorosament contraindicats en els nens. Cimolai i el seu grup el 1993 van observar que l'ús d'aquests fàrmacs durant més de 24 hores s'associava amb el desenvolupament de la síndrome hemoliticourèmica, i que també augmentava el risc de manifestacions neurològiques en els pacients que ja tenien la síndrome hemoliticourèmica (351, 352). Aquestes observacions han estat confirmades per altres autors (279, 286, 351, 353-355).

En el treball original de Riley el 1983 (18) no es va poder evidenciar diferències en l'evolució dels malalts tractats amb antibiòtics i els no tractats. El 1987 en un brot a Canadà es va poder constatar que les persones que havien pres antibiòtics presentaven un pronòstic pitjor que les que no en preniën (272b). El tractament antibiòtic, doncs, sembla que no millora les infeccions per *E. coli* O157:H7, i en molts estudis s'ha associat a una mala evolució clínica de la infecció (286, 356, 357).

En l'anàlisi d'una epidèmia a la ciutat de Sakai (Japó), el 1996 es va observar que l'administració de fosfomicina s'associava amb una disminució significativa del risc de presentar la síndrome hemoliticourèmica, però només si aquest fàrmac s'administrava dintre dels tres primers dies després de l'aparició de la simptomatologia. L'administració de fosfomicina només es va comparar amb altres antibiòtics, però no amb els casos que no havien rebut antibiòtics (358).

En un estudi prospectiu aleatoritzat a Montreal (359), l'administració d'antibiòtics no va evitar l'aparició de la síndrome hemoliticourèmica. Aquest fet ha estat confirmat en altres estudis (353, 360).

D'altra banda, s'ha demostrat que en cultius d'*E. coli* verotoxígena exposats a antibiòtics *in vitro*, en particular les sulfamides i les quinolones, s'incrementa la producció de verotoxina (361, 362).

La contradicció d'aquests resultats amb estudis anteriors requereix el plantejament d'estudis prospectius. En el moment actual sembla prudent no administrar antibiòtics si el malalt no presenta una septicèmia associada.

## 6.2 Tractament de la síndrome hemoliticourèmica

Els pacients amb una infecció coneguda o sospitada per *E. coli* verotoxígena, que presenten símptomes o signes que puguin fer pensar en el desenvolupament de la síndrome hemoliticourèmica, han d'estar molt controlats.

Són de risc elevat tots els nens de menys de cinc anys, particularment els menors de dos anys que presenten diarrea amb sang; en aquests casos s'han de fer controls d'hematòcrit, hemograma, plaquetes, LDH, urea, creatinina, i anàlisi d'orina a diari, per detectar la proteïnúria i l'hematúria.

L'aparició de pal·lidesa, oligúria, augment de pes, i/o la detecció de plaquetopènia, d'eritròcits fragmentats a la mostra de sang perifèrica, de LDH incrementada, així com l'augment d'urea i creatinina i/o proteïnúria han de fer pensar en la progressió de la malaltia cap a la síndrome hemoliticourèmica i cal indicar l'ingrés hospitalari.

El tractament de la síndrome hemoliticourèmica comporta el control estricte del balanç hidroelectrolític, de la diüresi i de la tensió arterial, així com el tractament de la deshidratació i la insuficiència renal, sense oblidar l'aportació nutricional.

Abans de la introducció de la diàlisi, una gran proporció de nens amb alguna forma de síndrome hemoliticourèmica morien per sobrecàrrega de líquids, alteracions metabòliques o urèmia. Des de l'aplicació de la diàlisi de forma precoç ha canviat el pronòstic i en les sèries de seguiment més recents el pronòstic d'evolució mortal és menor d'un 10 % (363).

Com a conseqüència de l'aplicació dels protocols d'hidratació endovenosa, especialment en pacients oligoanúrics, es pot produir una sobrecàrrega de líquids. És important controlar a l'hospital aquests nens i vigilar l'aparició d'una hipertensió i les complicacions cardiovasculars de tipus de l'edema pulmonar o la insuficiència cardíaca congestiva. L'etiologia de l'edema pot estar relacionada amb la hipoalbuminèmia, l'afectació glomerular incipient, l'afectació tubular renal amb retenció de sodi o l'augment de la permeabilitat vascular.

Per al tractament de l'anèmia s'ha d'administrar una transfusió d'hematies si l'anèmia és simptomàtica o l'hematòcrit és inferior al 20 %. També està indicada la transfusió de plaquetes si el recompte està per sota de 10.000/mm<sup>3</sup> o l'hemorràgia és significativa, encara que s'ha de limitar al màxim perquè estimulen l'agregació intravascular.

També cal controlar i tractar la hipertensió arterial que pot aparèixer entre el 10 % i el 50 % de casos, tenint en compte que cal corregir les alteracions del sodi i controlar l'aparició de convulsions.

La majoria dels nens (85 % - 90 %) sobreviuen la fase aguda i recuperen la funció renal normal. La síndrome hemoliticourèmica requereix sobretot el control de la insuficiència renal, ja que entre un 30 % i un 50 % dels casos és necessària la diàlisi renal.

El tractament medicamentós ha estat molt discutit i variat. S'han emprat, entre d'altres, els corticoides, els antiagregants plaquetaris i gammaglobulines. Sembla que les transfusions de plasma i sobretot la plasmafèresi són potser els més eficaços. La decisió terapèutica serà en funció del criteri i l'experiència individual. Es fan necessaris més estudis per determinar el tractament òptim d'aquesta malaltia (364).



### 6.3 Control de les complicacions tardanes de la síndrome hemoliticourèmica

En una anàlisi prospectiva dels supervivents d'una epidèmia el 1993 se suggereix que, en general, el pronòstic de la síndrome hemoliticourèmica en el context d'una bona assistència és relativament bo, però s'ha de fer el seguiment per detectar les possibles complicacions.

La insuficiència renal crònica amb hipertensió apareix en un 4 % de pacients i fins a un 12 % en el seguiment a llarg termini. La recuperació completa de l'afectació renal és d'un 64 %.

En un grup de pacients seguits durant un període d'entre cinc i divuit anys després de l'episodi agut, el 39 % presentava una alteració o més, l'11 % tenia proteïnúria, el 10 % tenia com a única anomalia un aclariment de creatinina baix, el 13 % tenia proteïnúria i aclariment de creatinina baix, i un 5 % hipertensió, proteïnúria i aclariment de creatinina baix. En alguns d'aquests casos les anomalies apareixien després d'un temps d'aparent recuperació i l'oligonúria era el millor indicador per al seguiment evolutiu (365).

Les complicacions neurològiques poden ser lleus amb forma de símptomes d'irritabilitat, somnolència, canvis de comportament, atàxia, tremolors o disfuncions neurològiques més greus en una tercera part dels pacients ja en la fase aguda de la malaltia o posteriorment. Les convulsions tant de tipus unifocal com multifocal es donen entre un 10 % i un 20 % dels casos, i es poden agreujar si es produeix una hiponatrèmia o hipocalcèmia. També es pot produir coma, alteracions del to, postures distòniques i hemiparèsies transitòries o permanents. Les alteracions visuals i el nistagme s'observen més rarament (366).

Complicacions més infreqüents i que, fins i tot, es poden donar en casos de colitis per *E. coli* O157:H7 que no han presentat síndrome hemoliticourèmica són les que requereixen tractament quirúrgic com l'apendicitis i la invaginació intestinal (367).

## 7. Mesures per a la prevenció de les infeccions

### 7.1 Bases per a la prevenció i el control

El principal reservori de l'*E. coli* O157:H7 són els animals sans de l'espècie bovina. Un estudi continuat en boví dut a terme a Alemanya (368) posa de manifest que quasi tots els individus poden excretar aquest microorganisme per la femta en un o més períodes de la seva vida.

#### 7.1.1 Reducció dels nivells d'eliminació

Un dels mecanismes amb els quals es pot reduir el nivell de contaminació per *Escherichia coli* O157:H7 en el budell, i per tant en la matèria fecal dels animals portadors, és acidificant-lo. Això es pot aconseguir modificant la dieta de l'animal amb la inclusió de fenc de qualitat. De tota manera, no sembla que la disminució o l'eliminació d'aquests bacteris sigui deguda, exclusivament, a la reducció del pH, sinó també a la proliferació de bacteris probiòtics, els quals per diferents mecanismes podrien inhibir específicament aquest bacteri (243).

Entre les substàncies descrites per la seva capacitat d'inhibir el desenvolupament d'*Escherichia coli* O157:H7 es troben les colícines (369). Si s'administren bacteris productors de colícines a animals lliures d'*Escherichia coli* O157:H7, quan l'animal ingereix el microorganisme, el bacteri només roman en el rumen durant un període màxim de catorze dies (243). Els mateixos autors observen que quan inoculen els bacteris probiòtics en els animals portadors d'*Escherichia coli* O157:H7, aquests persisteixen com a portadors només durant un període màxim de 26 dies.

L'eficàcia del sistema d'inoculació amb probiòtics no només depèn de la soca, sinó de la capacitat per colonitzar el tub digestiu dels animals (242); per tant, cal fer inoculacions successives fins aconseguir la colonització (243).

A més, com que la dosi infectiva d'*E. coli* O157:H7 és excepcionalment baixa, és fàcil que, si no es respecten les bones pràctiques higièniques en els processos d'obtenció, les carns fresques, els preparats de carn i altres derivats carnis, així com la llet crua, presentin la quantitat de microorganismes suficient per causar la malaltia.

#### 7.1.2 Condicions de supervivència i creixement

Les condicions de supervivència i creixement d'*E. coli* O157:H7 en els aliments fa que l'única mesura eficaç per destruir el microorganisme sigui la introducció d'un tractament bactericida com la calor (cocció o pasteurització) o la irradiació (370).

*E. coli* O157:H7 sobreviu a temperatures de refrigeració i congelació. No hi ha cap variació en el nombre d'*E. coli* O157:H7 en carn picada congelada a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  i a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  durant nou mesos (371). D'altra banda pot créixer des dels  $10\text{ }^{\circ}\text{C}$  fins als  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ , amb una temperatura òptima de  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  (370), i s'ha observat la seva supervivència en aliments mantinguts a  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  durant una hora (372). Sobreviu en aliments àcids, de pH inferior a 4, a temperatures de refrigeració (entre  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  i  $5^{\circ}\text{C}$ ) (373) i amb mínima activitat d'aigua ( $A_w$  de 0,95) (371).

### 7.1.3 Els aliments com a mecanismes de transmissió

La transmissió a l'home es dona principalment pel consum d'aliments contaminats insuficientment tractats, com ara els productes de carn picada crus o poc cuits i la llet crua (370, 374).

La contaminació encreuada durant la preparació dels aliments ha estat una causa important d'infecció. Exemple d'aliments (368) implicats en brots d'*E. coli* O157:H7 són: hamburgueses, *roast beef*, llet crua, suc de poma fresc (sidra als Estats Units), iogurt, formatge, salsitxes fermentades, blat de moro cuit, maionesa, enciam i brots de llavors.

Com que l'únic mètode efectiu per eliminar *E. coli* O157:H7 dels aliments és introduir un tractament bactericida com la calor (cocció o pasteurització) o la irradiació, en els establiments alimentaris on es realitzi algun tractament d'aquest tipus, els esforços se centraran a garantir que el tractament s'aplica correctament. Els establiments on no es realitza cap tractament, l'observació de bones pràctiques d'higiene (BPH) i bones pràctiques de manipulació (BPM) per part dels manipuladors seran el mitjà per evitar la contaminació dels aliments, evitar les contaminacions encreuades entre aliments crus i cuits i/o reduir al màxim la multiplicació del microorganisme. Als annexos 1 a 4 es recullen diverses recomanacions sobre manipulació adreçades a la població en general, als consumidors, al personal que treballa en escorxadors i al personal que treballa en establiments de restauració col·lectiva.

### 7.1.4 L'aigua

S'ha de tenir en compte que alguns brots d'*E. coli* O157:H7 han estat vehiculats tant per aigua com per gel (375) contaminats amb matèria fecal. Aquest patògen és sensible als nivells de clor utilitzats habitualment als sistemes de potabilització de l'aigua i, per tant, es pot evitar garantint l'ús d'aigua potable en tota la cadena alimentària, prevenint el risc de contaminació en les xarxes de distribució d'aigua potable, particularment en casos de desastres naturals (inundacions) o durant els processos de reparació d'averies.

## 7.2 Mesures per prevenir que el microorganisme arribi als aliments

Tenint en compte tot el que s'ha exposat anteriorment, la millor manera de prevenir la contaminació dels aliments per *E. coli* O157:H7 és evitar que el microorganisme passi dels animals als aliments i, si això no s'ha pogut evitar, assegurar-se que els aliments de risc reben un tractament tèrmic suficient abans del seu consum de manera que se n'elimini el bacteri.

La varietat d'aliments implicats com a vehicles de transmissió suposa un repte important a l'hora de dissenyar estratègies de prevenció i control. Hi ha moltes causes d'infecció d'origen alimentari i molts punts en la cadena alimentària en els quals es pot contaminar l'aliment i on el patogen pot créixer i sobreviure. No hi ha una única mesura preventiva que pugui garantir la seguretat de tots els aliments.

Com en altres patògens entèrics, les mesures destinades a reduir la contaminació fecal encreuada són beneficioses per reduir les infeccions per *E. coli* O157:H7. La utilització de tècniques d'anàlisi de perills i punts crítics de control (APPCC) als escorxadors i les plantes de processament d'aliments, i les bones pràctiques de manipulació, són essencials per reduir la disseminació d'aquest microorganisme des dels animals als aliments (376).

### 7.2.1 Manipuladors

El personal que manipula els aliments desenvolupa una funció cabdal en la prevenció de la contaminació dels aliments. És important que s'adoptin les mesures necessàries per aconseguir que el personal manipulador apliqui criteris d'higiene en la manipulació dels aliments per tal de minimitzar el risc de transmissió de malalties d'origen alimentari.

#### **Formació**

La formació dels manipuladors d'aliments és bàsica per aconseguir l'aplicació rigorosa i consistent de les bones pràctiques d'higiene (BPH) i de les bones pràctiques de manipulació (BPM) en tots els sectors de la cadena alimentària. Si els manipuladors comprenen: *a)* els motius pels quals s'han establert les normes; *b)* les conseqüències de les malalties de transmissió alimentària (per exemple, la gravetat de les infeccions per *E. coli* O157:H7 en grups vulnerables), i *c)* la seva responsabilitat en el procés, això els pot motivar a aplicar les BPH i BPM amb continuïtat.

L'OMS recomana donar prioritat a la formació del personal directiu o responsables de les activitats alimentàries de les empreses per tal que puguin vetllar perquè el personal manipulador observi pràctiques de manipulació segura dels aliments. El personal responsable dels establiments ha d'organitzar la formació del seus treballadors i supervisar l'aplicació dels coneixements impartits.

En el disseny dels programes de formació a diferents nivells, i en la seva avaluació, s'han de tenir en compte les tasques que realitza cada manipulador o grup de manipuladors. És bàsic que el personal tingui el nivell de formació pertinent, segons les tasques que realitza, i que conegui els perills i les mesures preventives aplicables en el seu treball, amb referència a *E. coli* O157:H7, especialment els treballadors implicats en la preparació i el servei de menjars destinats als grups més vulnerables, com ara els nens menors de cinc anys, la gent gran i les persones hospitalitzades (377, 378).

L'educació i la formació són elements indispensables dels programes de control basats en els sistema d'APPCC en tots els sectors de la indústria alimentària. Aquesta formació ha de ser renovada i reafirmada periòdicament.

### **Adopció d'hàbits higiènics: rentar-se les mans**

Les mans i les parts descobertes dels braços s'han de rentar regularment amb sabó i aigua calenta, però particularment abans de començar a manipular aliments, després d'anar al lavabo (o de canviar bolquers d'infants, netejar malalts o gent gran) i després d'haver manipulat aliments crus o deixalles.

*E. coli* O157:H7, per la seva dosi infectant extremadament baixa (menys d'una desena d'organismes poden causar infecció), pot ser fàcilment vehiculada per les mans dels manipuladors als aliments. En aquest cas concret es fa més evident la importància d'adquirir l'hàbit de rentar-se metículosament les mans sempre després d'haver manipulat aliments crus, abans de manipular aliments preparats per al consum o després d'haver anat al lavabo.

És més fàcil mantenir les mans i els braços nets si les ungles es mantenen curtes i no es porten anells, polseres o rellotges, que afavoreixen l'acumulació de brutícia difícil d'eliminar. El rentat de mans pot reduir el nivell de microorganismes presents però mai no els elimina totalment. Per optimitzar-ne l'eficàcia és recomanable fer un doble rentat. En el primer rentat s'ha d'utilitzar un raspall d'ungles incidint especialment en la punta dels dits i les ungles, per tal d'arrossegar al màxim la brutícia, amb sabó i aigua calenta. A continuació es fa un segon rentat sense raspall, amb sabó i aigua calenta, de les mans i la part exposada dels braços. Finalment, s'han d'eixugar completament amb paper.

### **Comunicació d'alteracions de la salut**

Els exàmens mèdics i les anàlisis microbiològiques rutinàries dels manipuladors no són aconsellables (379) perquè només reflecteixen l'estat de salut del manipulador en un moment determinat i poden donar una falsa seguretat que no hi ha cap problema de salut.

Si un manipulador pateix alteracions de la salut que incloguin diarrea, vòmits, febre, icterícia o alteracions de la pell, ferides o cremades, ho haurà d'informar al responsable de l'establiment abans d'iniciar el seu treball. En aquests casos pot ser necessari assignar-los temporalment a altres tasques que no impliquin la manipulació d'aliments. S'ha de procurar que aquesta situació temporal no comporti desavantatges per al manipulador, ja que això suposaria una barrera per a l'exposició honesta de situacions d'alteració de la salut.

Una persona que pateix diarrea no ha de manipular aliments desprotegits. Les persones que pateixen diarrea eliminen microorganismes per la femta i, en el cas d'*E. coli* O157:H7 aquesta eliminació pot durar fins al voltant d'una setmana en les persones adultes (370).

No cal que els manipuladors pateixin infeccions manifestes perquè això suposi un perill per a la seguretat dels aliments. S'han descrit nombrosos casos de toxiinfeccions alimentàries causades per manipuladors asimptomàtics portadors de patògens a la pell, l'orofaringe o el tub digestiu. Per això és important fixar hàbits de manipulació higiènica com a prevenció sistemàtica de la contaminació vehiculada per les mans. Els manipuladors han d'evitar el contacte dels dits amb la boca, per això es prohibeix fumar, menjar, etc. Igualment el manipulador ha d'evitar sempre mossegar-se les ungles.

## 7.2.2 Contaminació encreuada

La contaminació encreuada dels aliments durant la preparació s'ha descrit com a causa important de brots de toxiinfecció alimentària. En el cas de la infecció per *E. coli* O157:H7, en què la dosi infectiva és tan baixa, és molt important evitar qualsevol tipus de contaminació encreuada, sobretot si es dona després que l'aliment hagi estat tractat tèrmicament o en aliments crus que es consumiran sense cap tractament posterior.

L'origen de la contaminació encreuada es pot produir ja a l'escorxador. Els animals, sobretot de l'espècie bovina, són el principal reservori d'*E. coli* O157:H7 en el seu tracte intestinal. Per això, el contingut intestinal d'aquests animals és la principal font de contaminació encreuada. La brutícia que pot estar present a la pell, principalment al voltant del recte, pot contaminar les canals si no s'observen les màximes condicions d'higiene durant l'escorxat. Així mateix, el contingut intestinal pot contaminar la canal si no es realitza una lligadura correcta de l'esòfag i el recte o si es produeix el trencament dels budells en el moment de la seva retirada.

Una de les fonts de contaminació encreuada són els aliments crus d'origen animal com les carns i els preparats carnis, els ous, la llet crua i també vegetals i fruites no rentats ni desinfectats.

Són un element molt important d'aquest tipus de contaminació els estris que han contactat amb aliments crus com la maquinària (picadors, talla-

dores, batedores, etc.), els ganivets, les pinces, els termòmetres, els cullerets, i els contenidors, com safates i caixes de reixeta.

També és freqüent la contaminació a partir de superfícies que han contactat amb aliments crus com superfícies de treball i manipulació, tallants i prestatges d'instal·lacions frigorífiques i d'emmagatzematge.

La contaminació encreuada també pot tenir lloc a partir de material i àrees diverses, així com de persones que treballen indirectament en la producció. No s'han d'oblidar, doncs, les robes de treball i draps diversos, tovalloles i embalatges. La contaminació encreuada també pot originar-se des de contenidors de deixalles, vàters, aigua no potable i d'altres.

### 7.2.3 Autocontrol de la seguretat dels aliments

La responsabilitat d'identificar i aplicar les mesures necessàries per mantenir les condicions higièniques de les operacions recauen primerament en els responsables de la indústria. En aquest context, el paper dels inspectors sanitaris és verificar que s'estan aplicant les bones pràctiques d'higiene (BPH) i les bones pràctiques de manipulació (BPM) adients, i que el sistema d'autocontrol instaurat és efectiu per prevenir els possibles perills dels aliments elaborats als establiments.

El sistema d'anàlisi de perills i punts crítics de control (APPCC) és un sistema d'autocontrol que identifica els perills específics d'un sistema productiu d'una indústria i les mesures preventives per al seu control. Es tracta, doncs, d'un sistema basat en la prevenció, molt sistemàtic, que permet prendre mesures immediates en el cas que s'observi alguna pèrdua de control en el procés d'elaboració que pugui originar l'aparició d'un possible perill, com seria la contaminació dels aliments per *E. coli* O157:H7. La implementació i l'aplicació de sistemes d'APPCC als escorxadors, a les indústries i als establiments de restauració són indispensables per garantir que els aliments no es contaminen en les diferents fases del processament, i que es destrueixen els microorganismes presents quan es realitza algun tractament tèrmic.

Totes les indústries alimentàries han d'establir un sistema de BPH i BPM que cobreixi totes les fases del procés de producció, des que les matèries primeres arriben a l'establiment fins que els productes finals són lliurats al mercat, independentment de la instauració efectiva del pla d'autocontrol basat en l'APPCC (380).

El RD 2207/1995, de 28 de desembre, que estableix les normes d'higiene relatives als productes alimentosos, regula l'obligatorietat de les empreses del sector alimentari d'instaurar i posar en pràctica sistemes d'autocontrol eficaços, que es basin en el sistema d'APPCC. Aquesta normativa no és aplicable a la producció primària, però les noves propostes legislatives de la UE ja preveuen aquesta fase de la producció.

És important reconèixer que, en certs punts de la cadena alimentària, amb activitats que no incloguin un tractament letal per als patògens (en escorxadors, en l'elaboració de preparats carnis i, en general, en establiments on els aliments no reben un tractament tèrmic suficient per eliminar el microorganisme), la instauració de l'APPCC té implícites unes limitacions, i no es pot considerar com un medi de garantir l'absència o l'eliminació de perills. Això és significatiu en el cas de perills com l'*E. coli* O157:H7.

En certs sectors, la legislació estableix requisits microbiològics per a productes crus obtinguts a les indústries. Una limitació que té el fet de valorar els resultats obtinguts en les anàlisis del producte final és que l'estudi de la presència de patògens i indicadors únicament en producte final no té utilitat per determinar en quina de les fases del procés s'haurà d'incidir. De fet, tindria més sentit estudiar mostres en diferents punts crítics de control. A més, en el cas concret d'*E. coli*, aquests paràmetres, en aliments crus, tenen valor com a indicadors de contaminació fecal, però aquesta no sempre es correlaciona amb la presència de patògens: hi pot haver nivells alts d'*E. coli* sense presència de patògens i, contràriament, *E. coli* O157:H7, que té una dosi infectiva molt baixa, hi pot ser present tot i que amb nivells d'*E. coli* dins de la norma.

Per últim, l'adequació dels resultats de les anàlisis d'un nombre limitat de mostres als límits establerts no és garantia que tot el lot de producció relacionat estigui lliure de contaminació.

Per tant, les anàlisis de producte final poden ser útils per detectar una desviació dels objectius definits prèviament a la instauració del conjunt d'actuacions destinades a reduir la contaminació del producte final, però no poden substituir la inspecció i la verificació *in situ* de l'aplicació correcta de les BPM i BPH.

## **7.3 Mesures per destruir o reduir els microorganismes presents en els aliments**

### **7.3.1 El tractament tèrmic**

*E. coli* O157:H7 és un microorganisme que es pot eliminar per destrucció tèrmica. En el marc dels sistemes d'APPCC, quan el processament d'un aliment inclogui un procés de tractament per calor (cocció, esterilització o pasteurització) que sigui determinant per a la seguretat del producte final, l'assoliment de les combinacions de temps/temperatura necessàries per a la destrucció dels patògens haurà d'estar considerat com a punt crític de control, per al qual s'han d'establir uns límits objectius i verificables (binoми temps/temperatura), així com les mesures correctores adients en el cas que no s'assoleixin els valors establerts.



### 7.3.2 La cocció

La cocció ha de ser un procés programat en el qual també poden ser eficaces tota una sèrie de combinacions de temps/temperatura. Per exemple, en cuinar una peça de carn rostida s'assoleix la mateixa letalitat microbiana a 54 °C durant 121 minuts que a 63 °C durant 3 minuts. Per tal que sigui eficaç, la cocció s'ha de programar basant-se en un conjunt de factors, entre d'altres, alguns de difícil determinació, com ara el nivell inicial de bacteris patògens en l'aliment cru, la temperatura de l'aliment abans del procés i el volum d'aliment sotmès a tractament.

Les característiques de l'aliment també afecten la letalitat de les temperatures de cocció. L'alt contingut en greix d'alguns aliments redueixen l'efectivitat de l'escalfor; contràriament, un nivell alt d'humitat en l'aliment o en el contingut del recipient afavoreixen la destrucció tèrmica. Els aliments amb alts continguts de sal o de sucres redueixen la letalitat de la cocció.

Diversos estudis han descrit l'habilitat d'*E. coli* O157:H7 per reforçar els mecanismes de supervivència mitjançant la inducció de respostes a estressos fisiològics subletals (381). Hi ha estudis que indiquen que el creixement del patògen a pH baixos pot conferir-li protecció encreuada contra l'escalfor (382, 383). Això té implicacions en processos de producció d'aliments àcids, com els productes carnis fermentats, en els quals s'ha d'utilitzar un tractament tèrmic per garantir la seguretat del producte.

En la cocció s'ha d'aconseguir que totes les parts de l'aliment arribin a la temperatura requerida durant el temps necessari per tal que sigui eficaç la destrucció dels patògens. Això s'ha de tenir especialment en compte a l'hora de cuinar peces grans, ja que una temperatura massa elevada en un forn o una fregidora pot provocar la formació d'una capa seca i dura a l'exterior que actua com a escut i impedeix la penetració de l'escalfor necessària a l'interior de la peça. La cocció d'aliments que no estan totalment descongelats pot impedir que s'assoleixi el binomi temperatura/temps necessari en el cor de l'aliment. La cocció de productes carnis embotits s'ha de programar per tal que no es produeixi la ruptura de la tripa abans no s'hagi assolit el tractament mínim necessari. En la utilització de microones per a la cocció o rescalfament dels aliments, s'ha de tenir en compte la distribució irregular de l'escalfor que es produeix, i s'haurà de mesclar o moure l'aliment per tal d'assegurar la destrucció dels patògens.

El color de la carn picada no és un indicador fiable que s'ha arribat a una temperatura prou elevada per destruir els bacteris patògens com *E. coli* O157:H7. Una quarta part dels pastissos de carn picada fresca es tornen de color marró abans d'arribar als 71 °C. D'altra banda, a 71 °C un pro-

ducte de carn picada cuinat d'una forma segura pot presentar un color marró o rosa, o qualsevol variació de marró o rosa, a partir d'una gran varietat de factors com, per exemple, si la carn picada era fresca o congelada, o la manera com s'ha descongelat la carn (384).

L'única forma d'assegurar l'eficàcia del tractament tèrmic és verificar sempre que s'ha assolit el binomi temps/temperatura en cada un dels lots de producció, amb la utilització d'un termòmetre.

El Food and Drug Administration Food Code dels Estats Units recomana temperatures internes de 68,5 °C durant quinze segons per coure els aliments d'origen animal. El Food Safety Inspection Service, també dels Estats Units, proposa una llista de temperatures i temps de cocció, segons l'aliment, que va des de 66,1 °C a més de 69,4 °C; per als aliments carnis recomana una temperatura instantània de cocció de 71,2 °C a l'interior; aquest servei recomana la utilització d'un termòmetre digital alimentari de lectura immediata per valorar la temperatura dels pastissos de carn picada. Els termòmetres alimentaris digitals estan dissenyats per fer-los servir cap al final del temps de cocció i registren la temperatura en uns deu segons. La majoria de termòmetres digitals alimentaris llegiran la temperatura en una petita àrea de la punta i solen penetrar mitja polsada en l'aliment. Si el pastís de carn picada no és prou gruixut per testar-lo des de sobre, o si el termòmetre digital utilitzat és de tipus disc, el termòmetre es pot inserir per un cantó.

Els termòmetres s'han de netejar i desinfectar entre usos per prevenir la reintroducció de patògens en l'aliment convenientment tractat.

La destrucció tèrmica dels patògens ha d'anar acompanyada de la protecció eficaç dels menjars ja preparats per al consum. Després de la cocció és fonamental prevenir la recontaminació dels aliments ja cuinats i lliures de patògens.

### 7.3.3 La pasteurització

La llet crua s'ha descrit com a aliment implicat en brots d'infecció per *E. coli* O157:H7. La comercialització de llet crua a doll està prohibida, a Catalunya, des de l'any 1990, i estan regulades les condicions de producció, envasament i comercialització de la llet crua envasada. A l'etiquetatge de la llet crua hi ha de figurar la menció "Llet crua: cal bullir-la per al consum", com a recomanació per als consumidors.

Amb el tractament tèrmic de la llet (pasteurització, esterilització o UHT), s'assegura la destrucció d'*E. coli* O157:H7. La pasteurització de la llet a 72 °C durant 16,2 segons elimina més de 10<sup>4</sup> ufc d'*E. coli* O157:H7 per mL (385). S'han de prendre les mesures adequades per evitar la possible recontaminació de la llet un cop tractada.

### 7.3.4 El binomi temps/temperatura

Per a la destrucció d'*E. coli* O157:H7 teòricament es poden utilitzar els següents binomis en el cor de la peça: 10 minuts a 65 °C, o alternativament 2 minuts a 70 °C, però es recomana que s'assoleixi una temperatura de, com a mínim, 70 °C.

Aquests binomis de temps/temperatura són suficients per destruir les formes vegetatives dels microorganismes patògens en general, però no per inactivar les toxines ni els patògens esporulats.

### 7.3.5 La irradiació

Als Estats Units actualment s'està valorant la irradiació de les carns fresques als escorxadors per destruir-hi els bacteris patògens. A aquest respecte, el Comitè Científic Veterinari de la CE expressa la seva preocupació per la utilització de tècniques de descontaminació durant el processament dels aliments que puguin tenir efectes adversos sobre els esforços realitzats tant a nivell de producció primària com en les fases inicials del processament dels aliments (380).

## 7.4 Reducció de microorganismes en vegetals de consum en cru

Les fruites i verdures es poden contaminar amb microorganismes patògens en diferents fases del procés de producció. Durant el cultiu, patògens normalment presents en el sòl, com ara *Clostridium botulinum*, *Bacillus cereus* i *Listeria monocytogenes* poden contaminar els vegetals. D'altres, com *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia coli* i *Campylobacter*, residents en el tracte digestiu dels animals i l'home, poden arribar als vegetals, juntament amb virus i paràsits, a través del contacte amb femtes (*E. coli* O157:H7 pot sobreviure fins a setanta dies en femtes de bovins) (386).

El contacte amb les femtes es pot donar per la presència de bovins o altres remugants en els cultius, per la caiguda al terra de fruits que posteriorment són recollits i incorporats a la cadena alimentària, per l'aplicació incorrecta d'adobs d'animals com a fertilitzants, per l'aigua de rec no tractada i per les aigües superficials.

Els agricultors i processadors també poden ser una font d'*E. coli* O157:H7, així com els insectes (387), i l'aigua i el gel utilitzats en el rentat i en la refrigeració dels vegetals. A més, en les operacions posteriors a la recollida: en la manipulació i preparació d'aquests productes en la indústria alimentària o a la llar es pot produir la contaminació creuada dels vegetals. Alguns dels brots d'*E. coli* O157:H7 han estat associats al consum de vegetals i fruites en cru, com ara enciam (388, 389), suc de poma no pasteuritzat (390-393), brots de raves (394) i brots d'alfals. *E. coli* O157:H7

pot créixer, entre d'altres, en daus de meló i síndria (395), enciam trossejat (396) i talls de cogombre (397).

En l'informe de l'OMS sobre la descontaminació superficial de fruites i vegetals de consum en cru (398) es valora l'eficàcia de diferents substàncies utilitzades amb aquesta finalitat (clor, diòxid de clor, brom, iode, fosfat trisòdic, compostos d'amoni quaternari, peròxid d'hidrogen, ozó i radiacions ionitzants). L'informe conclou que cap dels mètodes utilitzats actualment pot garantir l'absència total de patògens als vegetals de consum en cru.

#### **7.4.1 Desinfecció de vegetals crus amb clor i/o derivats**

Per desinfectar els productes vegetals el clor s'utilitza a concentracions de 50-200 ppm (50-200 mg de clor per litre d'aigua).

El clor es consumeix ràpidament en presència de matèria orgànica o quan s'exposa a l'aire, a la llum o a metalls. En diversos estudis (399, 400) s'ha observat que quan la temperatura de l'aigua de tractament és inferior a la temperatura dels productes per desinfectar, es produeix una infiltració d'aigua i microorganismes a l'interior dels teixits vegetals, a través d'obertures naturals (tiges) o mecàniques (talls), on els patògens queden protegits de l'acció inhibidòria del clor. L'aigua de tractament hauria d'estar idealment a 10 °C per damunt de la temperatura dels vegetals o fruites.

No aconseguir mantenir el nivell adequat de clor en l'aigua pot provocar un augment de la població bacteriana en els vegetals i les fruites. La solubilitat màxima del clor s'assoleix en aigua a 4 °C; en augmentar la temperatura s'afavoreix la vaporització del clor. Per tant, per utilitzar solucions de clor a temperatura superior a la dels vegetals, la solució s'haurà de preparar en el moment de la immersió i mantenir-hi els vegetals el temps just perquè s'assoleixi la reducció màxima possible.

En un estudi sobre la desinfecció de fulles d'enciam amb aigua clorada s'observà que ni l'augment de concentració de clor a valors superiors a 200-250 ppm, ni l'augment del temps d'immersió de cinc a trenta minuts no incrementen la reducció de patògens (401).

El procediment normal de netejar fulles d'enciam amb aigua corrent redueix la microflora en un 92 %. L'eficàcia del rentat amb aigua corrent s'incrementa si s'allarga el temps del rentat. La inclusió de 100 ppm de clor aconseguix una reducció del 97,8 % (a pH 9,0) (402).

En el cas de verdures o fruites de superfície irregular i rugosa és molt més difícil reduir la microflora a causa de la dificultat d'eliminar la matèria orgànica present a la superfície del producte.

L'eficàcia de la desinfecció de vegetals tallats és menor per l'alt nivell de matèria orgànica present en el suc alliberat i per l'afavoriment de l'absor-

ció de microorganismes a l'interior dels teixits a través dels talls, on queden protegits de l'acció inhibidòria de l'HOCl. Per això, els vegetals s'han de rentar i desinfectar abans de tallar-los, i s'han d'observar escrupoloses pràctiques d'higiene en tallar-los i en la conservació posterior. Si es deixen els vegetals en aigua, després del tractament amb clor, es pot anul·lar completament l'efectivitat de la desinfecció.

## 7.5 Prevenció de la transmissió directa

### 7.5.1 Prevenció dels casos secundaris

Encara que la mitjana de la durada del període d'excreció en nens és de 19 dies (270b), aquest període es pot allargar força ja que pot arribar a ser de més de cent dies (272a).

Atès que *E. coli* O157:H7 pot ocasionar un ventall molt ampli de manifestacions clíniques que inclouen formes greus de malaltia (síndrome hemolíticourèmica i púrpura trombòtica trombocitopènica) i de mort, les mesures preventives que cal adoptar per evitar l'aparició de casos secundaris han de ser més exigents que per a altres malalties de transmissió entèrica (salmonel·losi, shigel·losi, campilobacteriosi o d'altres) (269, 271).

Aquestes mesures són especialment importants quan entre els contactes dels casos hi ha nens petits.

En un estudi realitzat per Heuvelink i col·laboradors (403) sobre contactes de casos de síndrome hemolíticourèmica es va observar que la infecció era més freqüent entre germans que en els pares.

En essència, les mesures per evitar els casos secundaris es basen en una higiene de mans molt escrupolosa (264, 273). A la taula 14 es mostren els aspectes més importants d'aquesta higiene.

#### Taula 14. Mesures higièniques per evitar l'aparició de casos secundaris

- Cal rentar sovint les mans amb aigua (preferiblement calenta) i sabó, i és obligatori fer-ho després d'anar al lavabo i abans de contactar amb els aliments.
- Les mans s'han d'eixugar amb tovallola de paper d'un sol ús.
- Els nens menors de cinc anys s'han de rentar les mans després d'anar al lavabo i abans de menjar, i aquest rentat l'han de supervisar els mestres o cuidadors.
- El mobiliari, els jocs i el material didàctic dels nens menors de cinc anys s'han de rentar i desinfectar sovint.
- Cal evitar els jocs amb aigua i sorra durant els brots.

### Evicció escolar

A les guarderies i centres de preescolar on van nens de menys de cinc anys, es recomana adoptar les següents mesures en situació de brot (12, 262, 264, 271, 404):

- Supervisió estricta del compliment de les mesures higièniques detallades a la taula 14.
- Els nens amb diarrea no poden anar a classe fins que deixin de tenir-ne. Si es tracta d'un cas confirmat de gastroenteritis per *E. coli* O157:H7 és recomanable esperar a tenir dues mostres de femta negatives, separades per un interval de 48 hores, per reduir el risc de transmissió i aparició de casos secundaris. Aquesta mesura és igualment aplicable encara que es tracti d'un cas aïllat.
- Cal informar els pares dels nens amb diarrea o amb gastroenteritis per *E. coli* O157:H7 confirmada que els nens no poden anar a cap altre centre o guarderia.
- Quan en una guarderia o centre de preescolar hi ha un brot de gastroenteritis per *E. coli* O157:H7 (definit com dos o més casos de gastroenteritis amb aïllament del microorganisme) és convenient no admetre cap nen nou fins que s'acabi el brot.
- Les mesures indicades, que els tècnics de les unitats de vigilància epidemiològica valoraran de forma individualitzada, s'han de donar per escrit als mestres, cuidadors i pares.
- A les famílies dels nens amb diarrea se'ls ha de donar informació sobre la importància de respectar les mesures d'higiene abans esmentades també a casa, especialment si hi ha altres nens petits.

A més del nens menors de cinc anys, persones pertanyents a altres grups quan tenen enteritis són d'especial risc per la possibilitat de transmetre l'agent infecciós a persones susceptibles. Entre aquests grups s'inclouen (262, 264):

- Persones que realitzen activitats de manipulació sobre aliments que es consumeixen crus o sense cocció posterior. Aquestes persones s'han d'excloure de la seva feina fins que hagin passat 48 hores sense símptomes i amb la femta ben formada. Es recomana esperar a tenir dos coprocultius negatius.
- Personal sanitari o personal que té cura de persones en les quals la gastroenteritis per *E. coli* O157:H7 pogués tenir conseqüències greus. Aquestes persones s'han d'excloure de la seva feina fins que siguin asimptomàtiques i tinguin la femta ben formada. Es recomana esperar a tenir dos coprocultius negatius.

- Per a les persones (nens o adults) amb malalties mentals o incapacitats que poden tenir incontinència és important supervisar especialment que les mesures d'higiene assenyalades se segueixin correctament tant a la institució com al seu domicili particular. Si es tracta de casos confirmats és recomanable esperar a tenir dos coprocultius negatius abans que tornin a la institució.
- La recent descripció de brots de gastroenteritis per *E. coli* en presons (405, 406) suggereix que també en aquestes institucions cal extremar les precaucions per evitar l'aparició de casos secundaris.

Si es tracta de nens de més de cinc anys, poden tornar a l'escola quan desaparegui la diarrea, si bé és fonamental vetllar pel rentat de mans amb aigua i sabó després d'anar al lavabo i abans de dinar.

En qualsevol cas caldrà fer un seguiment de l'epidemiologia d'aquesta infecció relativament nova en la comunitat per tal que les recomanacions s'adeqüin a les noves dades disponibles (407, 408).

### **Contacte amb animals**

Tant els adults com els nens que tinguin contacte directe amb animals de producció sans, en granges o altres indrets, se'ls ha d'informar del risc potencial de transmissió d'aquest microorganisme.

En el sector del turisme rural, també, s'ha de facilitar la informació pertinent per tal de promoure pràctiques estrictes d'higiene i habilitar dispositius per rentar-se les mans, tenint en compte l'especial vulnerabilitat dels nens, ja que diversos brots han tingut lloc entre escolars després de visites a granges.

## 8. Vigilància epidemiològica

A causa de l'elevada contagiositat, pel fet que es pot transmetre mitjançant els aliments i l'aigua i que pot posar en perill la vida, tant la gastroenteritis per *E. coli* O157:H7 com la síndrome hemolíticourèmica són malalties candidates a ser vigilades. Encara que la detecció i l'estudi de casos esporàdics contribueix a conèixer millor l'epidemiologia de la malaltia (no hem d'oblidar que és una malaltia nova de la qual encara queden molts aspectes per conèixer), sens dubte el màxim interès de la vigilància epidemiològica per aquestes malalties és identificar brots epidèmics que estiguin produïts pel consum d'aliments contaminats o per ingesta d'aigua contaminada, ja que un cop identificada l'exposició cal actuar enèrgicament per evitar que aquesta continuï.

La baixa dosi infectant i l'extremada tolerància als àcids del bacteri que s'han comentat anteriorment són característiques que faciliten l'aparició de brots que ocasionen molts casos primaris (és a dir, casos que han estat sotmesos a l'exposició de risc) i també casos secundaris (casos que apareixen entre persones que no han sofert l'exposició de risc i que es produeixen per transmissió persona-persona a partir dels casos primaris).

Per aquest motiu interessa que el mètode de vigilància sigui especialment sensible per detectar brots epidèmics. Tanmateix, s'ha de tenir en compte que sigui quin sigui el procediment que s'utilitza per detectar brots, sempre hi haurà subdetecció perquè (271): *a*) no en totes les persones amb diarrea compatible amb *E. coli* O157:H7 es practica coprocultiu; *b*) no sempre es busca selectivament *E. coli* O157:H7; *c*) no sempre es comuniquen els aïllaments als serveis de Salut Pública. Per això, algunes estimacions (408) consideren que la subnotificació de casos de gastroenteritis per *E. coli* O157:H7 pot ser al voltant del 80 %.

Als Estats Units, on l'*E. coli* O157:H7 va començar a originar brots l'any 1982, l'any 1993 es van incloure dues entitats com a malalties de declaració obligatòria: la síndrome hemolíticourèmica, que no és específica d'*E. coli* O157:H7 però que és molt suggerent (409), i la gastroenteritis per *E. coli* O157:H7.

A Europa en l'actualitat hi ha set països que tenen algun sistema de vigilància de la infecció per *E. coli* O157:H7 o de la síndrome hemolíticourèmica (410) (taula 15).

La infecció per *E. coli* enterohemorràgica és de declaració obligatòria a tres països: Àustria, Finlàndia i Suècia, i la síndrome hemolíticourèmica no és de declaració obligatòria a cap país europeu.



**Taula 15. Font de dades sobre infeccions per *E. coli* enterohemorràgica i la síndrome hemolíticourèmica a quinze països europeus (any d'introducció)**

País	Infeccions per <i>E. coli</i> enterohemorràgica			Síndrome hemolíticourèmica		
	Declaració obligatòria	Sistemes sentinella	Altres fonts <sup>1</sup>	Declaració obligatòria	Sistemes sentinella	Altres fonts <sup>1</sup>
Alemanya			x			x
Àustria	x (1996)		x		x (1994)	
Bèlgica		x (1994)				x
Dinamarca			x			x
Espanya			x			x
Finlàndia	x (1994)	x (1996)				x
França					x (1995)	
Grècia			x			
Irlanda			x		x (1997)	
Itàlia		x (1991)	x		x (1998)	
Països Baixos		x (1996)	x			x
Portugal						
Regne Unit						
Anglaterra		x (1996)			x (1997)	
Escòcia		x (1984)			x (1997)	
Irlanda del Nord		x (1988)			x (1997)	
País de Gal·les		x (1987)			x (1997)	
Suècia	x (1996)					
Suïssa			x		x (1997)	

1. Es tracta d'informacions *ad hoc*.

Font: Ammon (410).

A Catalunya, després d'haver valorat la baixíssima incidència de la malaltia existent abans del brot de setembre de 2000, no s'havia considerat necessari fer cap d'aquests processos de declaració obligatòria.

L'any 1998 es va decidir incloure en el Sistema de Notificació Microbiològica de Catalunya *E. coli* verotoxígena entre els agents causants d'enteritis que s'havien de notificar setmanalment a la Direcció General de Salut Pública. Tanmateix, fins al setembre de 2000 s'havia notificat un sol cas esporàdic.

Després del primer brot produït a Catalunya que va afectar diverses escoles de la província de Barcelona servides per una mateixa empresa de *catering*, s'ha decidit incloure, com als Estats Units, les dues entitats —la gastroenteritis per *E. coli* O157:H7 i la síndrome hemolíticourèmica— en la llista de malalties de declaració obligatòria. La síndrome hemolíticourèmica no és pa-

togmomònica de la infecció per *E. coli* O157:H7 (18, 23) però atès que es produeix entre un 7 % i un 12 % dels casos de gastroenteritis per *E. coli* (30, 196, 411) actuaria com un fet sentinella (271). És lògic, per tant, que malgrat les estimacions fetes segons les quals només un 5 % d'infeccions per *E. coli* O157:H7 desenvolupen la síndrome hemolíticourèmica (12), les dades recollides en alguns sistemes de vigilància mostrin percentatges superiors d'aquesta síndrome (12 %) (196).

Aquestes dues entitats s'han de declarar de manera individualitzada, és a dir, aportant dades identificatives dels pacients i del metge declarant, i a més, urgent, és a dir, avançant per qualsevol mitjà ràpid la seva notificació. De la notificació urgent es pot obtenir un clar benefici en la prevenció de casos. Bell *et al.* (281), en un brot produït als Estats Units, va estimar que el nombre de casos evitats podia ser de 800.

La definició de cas adoptada a Catalunya per a cadascuna d'aquestes entitats es presenta a continuació:

## **Gastroenteritis per *Escherichia coli* O157:H7**

### **Descripció clínica**

Malaltia de gravetat variable que es caracteritza per diarrea (sovint amb sang) i dolor abdominal. La malaltia es pot complicar i produir síndrome hemolíticourèmica o púrpura trombòtica trombocitopènica; també hi poden haver infeccions asimptomàtiques.

### **Criteris de laboratori per al diagnòstic**

Un dels següents:

- Aïllament d'*Escherichia coli* O157:H7\* d'una mostra clínica.
- Aïllament d'*Escherichia coli* O157:NM\*\* verotoxígena d'una mostra clínica.

### **Cas confirmat**

Malaltia clínicament compatible confirmada per laboratori.

### **Cas sospitós**

Cas clínicament compatible que està relacionat epidemiològicament amb un cas confirmat.

\* En la pràctica, totes les soques d'*Escherichia coli* O157:H7 són verotoxígenes.

\*\* Algunes soques verotoxígenes d'*E. coli* O157:H7 han perdut l'antigen flagel·lar i per això no són mòbils (NM).

## **Síndrome hemoliticourèmica postdiarreica**

### **Descripció clínica**

La síndrome hemoliticourèmica es caracteritza per l'inici agut d'una anèmia microangiopàtica hemolítica, afectació renal i plaquetopènia. Quan a aquestes mateixes manifestacions clíniques s'afegeixen afectació del sistema nerviós central i febre, l'entitat clínica es coneix com púrpura trombòtica trombocitopènica (PTT). La majoria dels casos de síndrome hemoliticourèmica es presenten després d'una gastroenteritis aguda.

### **Criteris de laboratori per al diagnòstic**

Anèmia aguda amb canvis microangiopàtics en sang perifèrica.

Afectació renal aguda caracteritzada per hematúria o proteïnúria o augment del nivell de creatinina.

### **Cas confirmat**

Malaltia aguda diagnosticada clínicament com síndrome hemoliticourèmica (SHU) o púrpura trombòtica trombocitopènica (PTT) que compleix tots els criteris de laboratori i comença durant el període de les tres setmanes després d'un episodi agut de diarrea.

### **Cas sospitós**

- Malaltia aguda diagnosticada clínicament com a SHU o PTT que compleix els criteris de laboratori en un malalt que no té història de diarrea aguda durant les tres setmanes abans.
- Malaltia diagnosticada clínicament com a SHU o PTT que es presenta durant les tres setmanes després de l'inici d'un quadre de diarrea aguda i en la qual els canvis microangiopàtics no estan confirmats.

## **Com i a qui cal notificar?**

D'acord amb el sistema vigent a Catalunya per notificar casos de malaltia i brots epidèmics, quan un metge sospiti una síndrome hemoliticourèmica o quan tingui coneixement que l'agent causal d'una gastroenteritis és *E. coli* O157:H7 ha de notificar el fet urgentment (abans que transcorrin 24 hores) per telèfon, fax o un altre procediment a la Unitat de Vigilància Epidemiològica que li correspongui per territori. A l'annex 5 es mostren les adreces, els telèfons i els faxes de les diferents unitats de vigilància epidemiològica de Catalunya.

A més, haurà d'emplenar l'imprès de declaració individualitzada que recull les dades identificatives del cas i del declarant (annex 6).

L'objectiu de la notificació urgent és poder iniciar precoçment les activitats d'investigació del possible origen del cas i detectar la possible existència de casos associats (brot epidèmic), així com també les actuacions de control que siguin necessàries (281, 412).

Si a partir de les primeres dades que es comuniquen sembla que es tracta d'un cas esporàdic (que no està aparentment relacionat amb cap altre cas) caldrà realitzar una enquesta epidemiològica detallada utilitzant una fitxa específica (annex 7).

## 9. Bibliografia

1. Satcher D. Emerging infections: getting ahead of the curve. *Emerg Infect Dis* 1995; 1: 1-6.
2. Morse SS. Factors in the emergence of infectious diseases. *Emerg Infect Dis* 1995; 1: 7-15.
3. McDade JE, Hughes JM. New and emerging infectious diseases. A: Mandell GL, Bennett JE, Dolins R, ed. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 5a ed. Filadèlfia: Churchill Livingstone, 2000: 178-183.
4. Cohen ML. Changing patterns of infectious disease. *Nature* 2000; 406: 762-767.
5. Ostroff SM, Leduc JW. Global epidemiology of infectious diseases. A: Mandell GL, Bennett JE, Dolins R, ed. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 5a ed. Filadèlfia: Churchill Livingstone, 2000: 167-178.
6. Rosenberg SM, Thulin C, Harris RS. Transient and heritable mutators in adaptive evolution in the laboratory and in nature. *Genetics* 1998; 148: 1559-1566.
7. Whittam TS, McGraw EA, Reid SD. Pathogenic *Escherichia coli* O157:H7: A model for emerging infectious disease. A: *Biomedical Research Reports*. San Diego: Academic Press, 2000: 163-183.
8. Whittam TS, Reid SD, Selander RK. Mutators and long-term molecular evolution of pathogenic *E. coli* O157:H7. *Emerg Infect Dis* 1998; 4: 615-617.
9. Armstrong GL, Hollingsworth J, Morris JG. Emerging foodborne pathogens: *Escherichia coli* O157:H7 as a model of entry of a new pathogen into the food supply of the developed world. *Epidemiol Rev* 1996; 18: 29-51.
10. Hancock DD, Besser TE, Kinsel ML, Tarr PI, Rize DH, Paros MG. The prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy and beef cattle in Washington State. *Epidemiol Infect* 1994; 113: 199-207.
11. Benjamin MM, Datta AR. Acid tolerance of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 1995; 61: 1669-1672.
12. Mead PS, Griffin PM. *Escherichia coli* O157:H7. *Lancet* 1998; 352: 1207-1212.
13. Waterman SR, Small PLC. Characterization of the acid resistance phenotype and *rpoS* alleles of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1996; 64: 2808-2811.
14. Konowalchuk J, Speir JI, Stavric S. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1977; 18: 775-779.
15. Smith HW, Lingood MA. The transmissible nature of enterotoxin production in a human enteropathogenic strain of *Escherichia coli*. *J Med Microbiol* 1971; 4: 301-305.

16. Wade W, Thons BT, Evans N. Cytotoxic enteropathogenic *Escherichia coli*. *Lancet* 1979; 2: 1235-1236.
17. Hardas UD, Jalgaonkar SV, Kulkarni VK. Cytotoxic effect of culture filtrate of enteropathogenic *Escherichia coli* from diarrhoea in children on vero cell culture. *Indian J Med Res* 1982; 76: 86-88.
18. Riley LW, Remis RS, Helgerson SD, McGee HB, Wells JG, Davis BR *et al*. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N Engl J Med* 1983; 308: 681-685.
19. Johnson WM, Lior H, Bezanson GS. Cytotoxic *Escherichia coli* O157:H7 associated with haemorrhagic colitis in Canada. *Lancet* 1983; i: 76.
20. O'Brien AD, Lively TA, Chen ME, Rothman SW, Formal SB. *Escherichia coli* O157:H7 strains associated with haemorrhagic colitis in the United States produce a *Shigella dysenteriae* 1 (Shiga) like cytotoxin. *Lancet* 1983; i: 702.
21. O'Brien AD, LaVeck GD, Thompson MR, Formal SB. Production of *Shigella dysenteriae* type 1-like cytotoxin by *Escherichia coli*. *J Infect Dis* 1982; 146: 763-769.
22. Karmali MA, Steele BT, Petric M, Lim C. Sporadic cases of hemolytic uremic syndrome associated with fecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. *Lancet* 1983; i: 619-620.
23. Karmali MA, Petric M, Lim C, Fleming PC, Arbus GS, Lior H. The association between idiopathic hemolytic uremic syndrome and infections by verotoxin-producing *Escherichia coli*. *J Infect Dis* 1985; 151: 775-782.
24. Scotland SM, Smith HR, Willshaw GA, Rowe B. Vero cytotoxin production in a strain of *Escherichia coli* determined by genes carried on bacteriophage. *Lancet* 1983; ii: 216.
25. Strockbine NA, Marques LRM, Newland JW, Smith HW, Holmes RK, O'Brien AD. Two toxin-converting phages from *Escherichia coli* O157:H7 strain 933 encode antigenically distinct toxins with similar biologic activities. *Infect Immun* 1986; 53: 135-140.
26. Acheson DWK, Jaeger JL. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Newsl* 1999; 21: 183-188.
27. Su C, Brandt LJ. *Escherichia coli* O157:H7 infection in humans. *Ann Intern Med* 1995; 123: 698-714.
28. Paton JC, Paton AW. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11: 450-479.
29. Karmali MA. Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 1989; 2: 15-38.
30. Griffin PM, Tauxe RV. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli* and the associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiol Rev* 1991; 13: 60-98.

31. Tarr PI. *Escherichia coli* O157:H7: Clinical, diagnostic, and epidemiological aspects of human infection. *Clin Infect Dis* 1995; 20: 1-10.
32. Kaper JB, O'Brien DA. *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* strains. Washington DC: ASM Press, 1998.
33. Barry I, Eisenstein, Zaleznik DF. *Enterobacteriaceae*. A: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, ed. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 5a ed. Filadèlfia: Churchill Livingstone, 2000; 2294-2310.
34. Bopp CA, Brenner FW, Wells JG, Strockbine NA. *Escherichia, Shigella* and *Salmonella*. A: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH, ed. *Manual of Clinical Microbiology*, 7a ed. Washington DC: ASM Press, 1999: 459-474.
35. Prats G, Mirelis B. Enterobacterias. Características generales. Enterobacterias oportunistas. *Escherichia coli*. A: García-Rodríguez JA, Picazo JJ, ed. *Microbiología Médica*. Madrid: Mosby / Doyma Libros SA, 1996: 223-238.
36. Baquero F. Microflora normal del hombre. A: Perea E, ed. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. Barcelona: Ediciones Doyma, 1992: 31-45.
37. Escherich T. Die Darmbakterien der Säuglings und Neugeborenen. *Fortschr Med* 1885; 3: 515-522.
38. Neidhardt FC, ed. *Escherichia coli* and *Salmonella*: *Cellular and molecular biology*, 2a ed. Washington DC: ASM Press, 1996.
39. Neidhardt FC, Ingraham JL, Schaechter M. Physiology of the bacterial cell: A molecular approach. Sunderland, Mass: Sinauer Associates, 1990.
40. Robinow C, Kellenberger E. The bacterial nucleoid revisited. *Microbiol Rev* 1994; 58: 211-232.
41. Snyder L, Champness W. *Molecular genetics of bacteria*. Washington DC: ASM Press, 1997.
42. Lewin. *Genes VII*. Oxford: Oxford University Press, 2000.
43. Ghuyssen JM, Hakenbeck R, ed. *Bacterial cell wall*. Nova York: Elsevier, 1994.
44. Bayer ME, Bayer MH. Biophysical and structural aspects of the bacterial capsule. *ASM News* 1994; 60: 192-198.
45. Doetsch RN, Sjoblad RD. Flagellar structure and function in eubacteria. *Ann Rev Microbiol* 1980; 34: 69-108.
46. Beachey EH. *Bacterial adherence receptors and recognition*. Londres: Chapman and Hall, 1980.
47. Le Minor L, Veron M. *Bactériologie Médicale*. París: Flammarion Médecine-Sciences, 1989.
48. Ewing WH. *Edwards and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae*. 4a ed. Nova York: Elsevier, 1986.
49. Le Minor L, Richard C. *Méthods de laboratoire pour l'identification des entérobacteries*. París: Institut Pasteur de Paris, 1993.





66. Sussman M, ed. *Escherichia coli: Mechanisms of virulence*. Cambridge: U Press Cambridge, 1997.
67. Nataro JP, Japer JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11: 142-301.
68. Johnson J. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infections. *Clin Microbiol Rev* 1991; 4: 80-128.
69. MacLaren DM. Soft tissue infection and septicemia. A: Sussman M, ed. *Escherichia coli: Mechanisms of virulence*. Cambridge: U. Press Cambridge, 1997: 469-493.
70. Sethabutr O, Echeverria P, Hoge CW, Bodhidatta L, Pitarangsi C. Detection of *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* by PCR in the stools of patients with dysentery in Thailand. *J Diarrhoeal Dis Res* 1994; 12: 265-269.
71. Brenner DJ, Fanning GR, Miklos GV, Steigerwalt AG. Polynucleotide sequence relatedness among *Shigella* species. *Int J Syst Bacteriol* 1973; 23: 1-7.
72. Centers for Disease Control and Prevention. Foodborne outbreaks of enterotoxigenic *Escherichia coli*. Rhode Island and New Hampshire, 1993. *MMWR* 1994; 43: 81-89.
73. DuPont HL, Formal SB, Hornick RB, Snyder MJ, Libonati JP, Sheahan DG *et al*. Pathogenesis of *Escherichia coli* diarrhea. *N Engl J Med* 1971; 285: 1-9.
74. Levine MM, Ferreccio C, Prado V, Cayazzo M, Abrego P, Martínez J *et al*. Epidemiologic studies of *Escherichia coli* diarrheal infections in a low socioeconomic level peri-urban community in Santiago, Chile. *Am J Epidemiol* 1993; 138: 849-869.
75. Levine MM, Edelman R. Enteropathogenic *Escherichia coli* of classic serotypes associated with infant diarrhea: epidemiology and pathogenesis. *Epidemiol Rev* 1984; 6: 31-51.
76. Henry FJ, Udo AS, Wanke CA, Aziz KMA. Epidemiology and persistent diarrhea and etiologic agents in Mirzapur, Bangladesh. *Acta Paediatr* 1996; 381 Supl.: 27-31.
77. Prats G, Llovet T, Muñoz C, Solé R, Mirelis B, Izquierdo C *et al*. Etiología de las enteritis en un hospital general universitario en Barcelona (1992-1995). *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1997; 15: 349-356.
78. Gascón J, Vila J, Valls ME, Ruiz L, Vidal J, Corachan M, *et al*. Etiology of traveller's diarrhea in spanish travellers to developing countries. *Eur J Epidemiol* 1993; 9: 217-223.
79. Prats G, Frias C, Margall N, Llovet T, Gazleturrutia L, Elcuaz R *et al*. Colitis hemorrágica por *Escherichia coli* verotoxigénica. Presentación de 9 casos. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1996; 14: 7-15.
80. Acheson DWK, Keusch GT. Which Shiga toxin-producing types of *Escherichia coli* are important?. *ASM News* 1996; 6: 302-306.
81. Beutin L, Zimmermann S, Gleier K. Humans infections with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* other than serogroup O157 in Germany. *Emerg Infect Dis* 1998; 4: 635-639.

82. Tarr PI, Neill MA. Perspective: The problem of non-O157:H7 Shiga-like (verocytotoxin)-producing *Escherichia coli*. *J Infect Dis* 1996; 174: 1136-1139.
83. Scotland SM, Cheasty T, Thomas A, Rowe B. Beta-glucuronidase activity of Verotoxin-producing strains of *Escherichia coli*, including serogroup O157, isolated in the United Kingdom. *Lett Appl Microbiol* 1991; 13: 42-44.
84. Wells JG, Davis BR, Wachsmuth IK, Riley LW, Remis RS, Sokolow R *et al.*. Laboratory investigation of hemorrhagic colitis outbreaks associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *J Clin Microbiol* 1983; 18: 512-520.
85. Schmidt H, Geitz C, Tarr PI, Frosch M, Karch H. Non-O157:H7 pathogenic Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: phenotypic and genetic profiling of virulence traits and evidence for clonality. *J Infect Dis* 1999; 179: 115-123.
86. Agin TS, Wolf MK. Identification of a family of intimins common to *Escherichia coli* causing attaching effacing lesions in rabbits, humans, and swine. *Infect Immun* 1997; 65: 320-326.
87. Donnenberg MS, Kaper JB, Finlay BB. Interactions between enteropathogenic *Escherichia coli* and host epithelial cells. *Trends Microbiol* 1997; 5: 109-114.
88. Donnenberg MS, Tzipori S, McKee ML, O'Brien AD, Alroy J, Kaper JB. The role of the *eae* gene of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in intimate attachment in vitro and in a porcine model. *J Clin Invest* 1993; 92: 1418-1424.
89. Kenny B, DeVinney R, Stein M, Reinscheid DJ, Frey EA, Finlay BB. Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfer its receptor for intimate adherence into mammalian cells. *Cell* 1997; 91: 511-520.
90. Meccas J, Strauss EJ. Molecular mechanisms of bacterial virulence: type III secretion and pathogenicity islands. *Emerg Infect Dis* 1996; 2: 271-288.
91. Jarvis KG, Girón JA, Jerse AE, McDaniel TK, Donnenberg MS, Kaper JB. Enteropathogenic *Escherichia coli* contains a specialized secretion system necessary for the export of proteins involved in attaching and effacing lesion formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 7996-8000.
92. O'Brien AD, La Veck GD. Purification and characterization of a *Shigella dysenteriae* 1-like toxin produced by *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1983; 40: 675-683.
93. Calderwood SB, Acheson DWK, Keusch GT, Barrett TJ, Griffing PM, Strockbine NA *et al.* Proposed new nomenclature for SLT (VT) family. *ASM News* 1996; 62: 118-119.
94. Rietra PJ, Willshaw GA, Smith HR, Field AM, Scotland SM, Rowe B. Comparison of verocytotoxin encoding phages from *Escherichia coli* of human and bovine origin. *J Gen Microbiol* 1989; 135: 2307-2318.
95. Tschäpe H, Prager R, Streckel W, Fruth A, Tietze E, Bohme G. Verotoxinogenic *Citrobacter freundii* associated with severe gastroenteritis and cases of haemolytic uraemic syndrome in a nursery school green butter as the infection source. *Epidemiol Infect* 1995; 114: 441-450.

96. Paton AW, Paton JC. *Enterobacter cloacae* producing a Shiga-like toxin II-related cytotoxin associated with a case of hemolytic uremic syndrome. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 463-465.
97. Muniesa M, Jofre J. Abundance in sewage of bacteriophages that infect *Escherichia coli* O157:H7 and that carry the Shiga toxin 2 gene. *Appl Environ Microbiol* 1998; 64: 2443-2448.
98. Lingwood CA, Law H, Richardson S, Petric M, Brunton JL, DeGrandis S *et al*. Glycolipid binding of natural and cloned *Escherichia coli* produced verotoxin in vitro. *J Biol Chem* 1987; 262: 8834-8839.
99. Waddell T, Head S, Petric M, Cohen A, Lingwood CA. Globotriosyl ceramide is specifically recognized by the *Escherichia coli* Verotoxin 2. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; 152: 674-679.
100. O'Brien AD, Holmes RK. Shiga and Shiga-like toxins. *Microbiol Rev* 1987; 51: 206-220.
101. Donohue-Rolfe A, Keusch GT, Edson C, Thorley-Lawson D, Jacewicz M. Pathogenesis of *Shigella* diarrhoea. IX. Simplified high yield purification of *Shigella* toxin and characterization of subunit composition and function by the use of subunit-specific monoclonal and polyclonal antibodies. *J Exp Med* 1984; 160: 1767-1781.
102. Fraser ME, Chernaia MM, Kozlov YV, James MN. Crystal structure of the holotoxin from *Shigella dysenteriae* at 2,5 Å resolution. *Nat Struct Biol* 1994; 1: 59-64.
103. Stein PE, Boodhoo A, Tyrrell GJ, Brunton JL, Real RJ. Crystal structure of the cell-binding B oligomer of verotoxin-1 from *E. coli*. *Nature* 1992; 355: 748-750.
104. Haddad JE, Jackson MP. Identification of the Shiga toxin A-subunit residues required for holotoxin assembly. *J Bacteriol* 1993; 175: 7652-7657.
105. Jemal C, Haddad JE, Begum D, Jackson MP. Analysis of Shiga toxin subunit association by using hybrid A polypeptides and site specific mutagenesis. *J Bacteriol* 1995; 177: 3128-3132.
106. De Grandis S, Law H, Brunton J, Gyles C, Lingwood CA. Globotetraosyl ceramide is recognized by the pig edema disease toxin. *J Biol Chem* 1989; 264: 1250-1255.
107. Samuel JE, Perera LP, Ward S, O'Brien AD, Ginsburg V, Krivan HC. Comparison of the glycolipid receptor specificities of Shiga-like toxin type II and Shiga-like toxin type II variants. *Infect Immun* 1990; 58: 611-618.
108. Pierard D, Huyghens L, Lauwers S, Lior H. Diarrhoeae associated with *Escherichia coli* producing porcine oedema disease verotoxin. *Lancet* 1991; 338: 762.
109. Thomas A, Cheasty T, Chart H, Rowe B. Isolation of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* serotypes O9ab:H<sup>-</sup> and O101:H<sup>-</sup> carrying VT2 variant gene sequences from a patient with haemolytic uremic syndrome. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994; 13: 1074-1076.
110. Kandel G, Donohue-Rolfe A, Donowitz M, Keusch GT. Pathogenesis of *Shigella* diarrhea. XVI. Selective targeting of shiga toxin to villus cell of rabbit jejunum

- explains the effect of the toxin on intestinal electrolyte transport. *J Clin Invest* 1989; 84: 1509-1517.
111. Sjogren R, Neill R, Rachmilewitz D, Fritz D, Newland J, Sharpnack D *et al.* Role of Shiga-like toxin I in bacterial enteritis: comparison between isogenic *Escherichia coli* strains induced in rabbits. *Gastroenterology* 1994; 106: 306-317.
  112. Fontaine A, Arondel J, Sansonetti PJ. Role of Shiga toxin in the pathogenesis of bacillary dysentery studied by using a Tox mutant of *Shigella dysenteriae* 1. *Infect Immun* 1988; 56: 3099-3109.
  113. Elliott E, Li Z, Bell C, Stiel D, Buret A, Wallace J *et al.* Modulation of host response to *Escherichia coli* O157:H7 infection by anti-CD18 antibody in rabbits. *Gastroenterology* 1994; 106: 1554-1561.
  114. Li Z, Bell C, Buret A, Robins-Browne R, Stiel D, O'Loughlin E. The effect of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 on intestinal structure and solute transport in rabbits. *Gastroenterology* 1993; 104: 467-474.
  115. Griffin PM. *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohemorrhagic *Escherichia coli*. A: Blaser MJ, Smith PD, Reavdin JI, Greenberg HB, Guerrant RL, ed. *Infections of the gastrointestinal tract*. Nova York: Raven Press, 1995; 739-761.
  116. Acheson DWK, Moore R, DeBreucker S, Lincicome LL, Jacewicz M, Skutelsky E, Keusch GT. Translocation of Shiga toxin across polarized intestinal cells in tissue culture. *Infect Immun* 1992; 64: 3294-3300.
  117. Barrett TJ, Potter ME, Wachsmuth IK. Continuous peritoneal infusion of Shiga-like toxin II (SLTI) as a model for SLT II-induced diseases. *J Infect Dis* 1989; 159: 774-777.
  118. Pickering LK, Obrig TG, Stapleton FB. Hemolytic-uremic syndrome and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Pediatr Infect Dis J* 1994; 13: 459-476.
  119. Louise CB, Obrig TG. Specific interaction of *Escherichia coli* O157:H7 derived Shiga-like toxin II with human renal endothelial cells. *J Infect Dis* 1995; 172: 1397-1401.
  120. Wadolkowski EA, Sung LM, Burris JA, Samuel JE, O'Brien AD. Acute renal tubular necrosis and death of mice orally infected with *Escherichia coli* strains that produce Shiga-like toxin type II. *Infect Immun* 1990; 58: 3959-3965.
  121. Melton-Celsa AR, Darnell SC, O'Brien AD. Activation of Shiga-like toxins by mouse and humans intestinal mucus correlates with virulence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O91:H21 isolates in orally infected, streptomycin-treated mice. *Infect Immun* 1996; 64: 1569-1576.
  122. Paton JC, Paton AW. Survival rate of mice after transient colonization with *Escherichia coli* O157:H7 clones carrying variant Shiga-like toxin type II operons. *Microb Pathog* 1996; 20: 377-383.
  123. Tesh VL, Ramegowda B, Samuel JE. Purified Shiga-like toxins induce expression of proinflammatory cytokines from murine peritoneal macrophages. *Infect Immun* 1994; 62: 5085-5094.

124. Harel Y, Silva M, Giroir B, Weinberg A, Cleary TB, Beutler B. A reporter transgene indicates renal-specific induction of tumor necrosis factor (TNF) by Shiga-like toxin. *J Clin Invest* 1993; 92: 2110-2116.
125. Kaye SA, Louise CB, Boyd B, Lingwood CA, Obrig TG. Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome: interleukin-1 enhancement of Shiga toxin cytotoxicity toward human vascular endothelial cells in vitro. *Infect Immun* 1993; 61: 3886-3891.
126. Louise CB, Obrig TG. Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome: combined cytotoxic effects of Shiga toxin interleukin-1, and tumor necrosis factor alpha on human vascular endothelial cells in vitro. *Infect Immun* 1991; 59: 4173-4179.
127. Schmidt H, Karch H, Beutin L. The large-sized plasmids of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 strains encode hemolysins which are presumably members of the *E. coli*  $\alpha$ -hemolysin family. *FEMS Microbiol Lett* 1994; 117: 189-196.
128. Schmidt H, Kernbach C, Karch H. Analysis of the EHEC *hly* operon and its location in the physical map of the large plasmid of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Microbiology* 1996; 142: 907-914.
129. Beutin L, Aleksic S, Zimmermann S, Gleier K. Virulence factors and phenotypic traits of verotoxigenic strains of *Escherichia coli* isolated from humans patient in Germany. *Med Microbiol Immunol* 1994; 183: 13-21.
130. Schmidt H, Karch H. Enterohemolytic phenotypes and genotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O111 strains from patients with diarrhea and hemolytic uremic syndrome. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 2364-2367.
131. Schmidt H, Beutin L, Karch H. Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL933. *Infect Immun* 1995; 63: 1055-1061.
132. Savarino SJ, McVeigh A, Watson J, Molina J, Cravioto A, Echeverria P *et al*. Enterotoxigenic *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin is not restricted to enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J Infect Dis* 1996; 173: 1019-1022.
133. Leyer GJ, Wang LL, Johnson EA. Acid adaptation of *Escherichia coli* O157:H7 increases survival in acidic foods. *Appl Environ Microbiol* 1995; 61: 3752-3755.
134. Gordon J, Small PLC. Acid resistance in enteric bacteria. *Infect Immun* 1993; 61: 6364-6367.
135. Whittam TS, Wilson RA. Genetic relationships among pathogenic *Escherichia coli* of serogroup O157. *Infect Immun* 1988; 56: 2467-2473.
136. Whittam TS, Wolfe ML, Wachsmuth IK, Orskov I, Orskov F, Wilson RA. Clonal relationships among *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis and infantile diarrhea. *Infect Immun* 1993; 61: 1619-1629.
137. Rodrigues J, Scaletsky CA, Campos LC, Gomes TAT, Whittam TS, Trabulsi LR. Clonal structure and virulence factors in strains of *Escherichia coli* of the classic serogroup O55. *Infect Immun* 1996; 64: 2680-2686.

138. Feng P, Lampel KA, Karch H, Whittam TS. Genetic and phenotypic changes in the emergence of *Escherichia coli* O157:H7. *J Infect Dis* 1998; 177: 1750-1753.
139. Bilge SS, Vary JC, Dowell SF, Tarr PI. Role of the *Escherichia coli* O157:H7, O side chain in adherence and analysis of an *rfb* locus. *Infect Immun* 1996; 64: 4795-4801.
140. Levine MM, Xu J, Kaper JB, Lior H, Prado V, Tall B. *et al.* A DNA probe to identify enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and other serotypes that cause hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome. *J Infect Dis* 1987; 156: 175-182.
141. Gunzer F, Böhm H, Rüssmann H, Bitzan M, Aleksic S, Karch H. Molecular detection of sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157:H7 in patients with hemolytic uremic syndrome. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 1807-1810.
142. Hayes PS, Blom K, Feng P, Lewis J, Strockbine NA, Swaminathan B. Isolation and characterization of a  $\beta$ -D glucuronidase-producing strain of *Escherichia coli* serotype O157:H7. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 3347-3348.
143. MacDonal KL, Osterholm MT. The emergence of *Escherichia coli* O157:H7 in the United States. The changing epidemiology of foodborne disease. *JAMA* 1993; 269: 2264-2266.
144. Palumbo SA, Call JE, Schultz FJ, Williams AC. Minimum and maximum temperatures for growth and verotoxin production by hemorrhagic strains of *Escherichia coli*. *J Food Prot* 1995; 58: 352-356.
145. Wang G, Doyle MP. Survival of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in water. *J Food Prot* 1998; 61: 662-667.
146. Meng J, Doyle MP. Microbiology of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in foods. A: Kaper JB, O'Brien AD, ed. *Escherichia coli O157:H7 and other Shiga toxin-producing E. coli strains*. Washington DC: ASM Press, 1998; 92-108.
147. Doyle MP, Zhao T, Meng J, Zhao S. *Escherichia coli* O157:H7. A: Doyle MP, Beuchat LR, Monville TJ, ed. *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. Washington DC: AMS Press, 1997: 171-191.
148. Glass KA, Loeffelholz JM, Ford JP, Doyle MP. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 as affected by pH or sodium chloride and in fermented, dry sausage. *Appl Environ Microbiol* 1992; 58: 2513-2516.
149. Brackett RE, Hao YY, Doyle MP. Ineffectiveness of hot acid sprays to decontaminate *Escherichia coli* O157:H7 on beef. *J Food Prot* 1994; 57: 198-203.
150. Zhao T, Doyle MP. Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in commercial mayonnaise. *J Food Prot* 1994; 57: 780-783.
151. Abdul-Raouf UM, Beuchat LR, Ammar MS. Survival and growth of *Escherichia coli* O157:H7 in ground, roasted beef as affected by pH, acidulants, and temperature. *Appl Environ Microbiol* 1993; 59: 2364-2368.
152. Lin J, Smith MP, Chapin K, Baik HS, Bennett GN, Foster JW. Mechanisms of acid resistance in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 1996; 62: 3094-3100.

153. Wisniewsky MA, Glatz BA, Gleason ML, Reitmeier CA. Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 counts on whole fresh apples treatment with sanitizers. *J Food Prot* 2000; 63: 703-708.
154. Foschino R, Nervegna I, Motta A, Galli A. Bactericidal activity of chlorine dioxide against *Escherichia coli* in water and on hard surfaces. *J Food Prot* 1998; 61: 668-672.
155. Lisle JT, Broadway SC, Prescott AM, Pyle BH, Fricker C, McFeters GA. Effects of starvation on physiological activity and chlorine disinfection resistance in *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol* 1998; 64: 4658-4662.
156. Meng J, Zhao S, Doyle MP, Joseph SW. Antibiotic resistance of *Escherichia coli* O157:H7 and O157:NM isolated from animals food and humans. *J Food Prot* 1998; 61: 1511-1514.
157. Sommer R, Lhotsky M, Haider T, Cabaj A. UV inactivation, liquid-holding recovery, and photoreactivation of *Escherichia coli* O157 and other pathogenic *Escherichia coli* strains in water. *J Food Prot* 2000; 63: 1015-1020.
158. Morabito S, Karch H, Mariani-Kurkdjian P, Schmidt H, Minelli F, Bingen E, Caprioli A. Enteroaggregative, Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O111:H2 associated with an outbreak of hemolytic uremic syndrome. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 840-842.
159. Goldwater PN, Bettelheim KA. New perspective on the role of *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohaemorrhagic *E. coli* serotypes in human disease. *J Med Microbiol* 1998; 47: 1039-1045.
160. Brooks HJ, Bettelheim KA, Todd B, Holdaway MD. Non-O157 verotoxin producing *Escherichia coli*: aetiological agents of diarrhoea in children in Dunedin, New Zealand. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 1997; 20: 163-170.
161. Huppertz HI, Busch D, Schmidt H, Aleksic S, Karch H. Diarrhea in young children associated with *Escherichia coli* non-O157 organisms that produce Shiga-like toxin. *J Pediatr* 1996; 128: 341-346.
162. Bonnet R, Souweine B, Gauthier G, Rich C, Livrelli V, Sirot J, *et al.* Non-O157:H7 Stx2-producing *Escherichia coli* strains associated with sporadic cases of hemolytic-uremic syndrome in adults. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 1777-1780.
163. Scotland SM, Willshaw GA, Smith HR, Rowe B. Properties of strains of *Escherichia coli* O26:H11 in relation to their enteropathogenic or enterohemorrhagic classification. *J Infect Dis* 1990; 162: 1069-74
164. Johnson, RP, Clarke RC, Wilson JB, Read SC, Rahn K, Renwick SA *et al.* Growing concerns and recent outbreaks involving non-O157:H7 serotypes of verotoxigenic *Escherichia coli*. *J Food Prot* 1996; 59: 1112-1122.
165. Ramotar K, Henderson E, Szumski R, Louie TJ. Impact of free verotoxin testing on epidemiology of diarrhea caused by verotoxin-producing *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 1114-1120.
166. Piérard. D, Stevens D, Moriau L, Lior H, Lauwers S. Tree years PCR screening for VTEC in human stools in Brussels. A: Karmali MA, Goglio AG, ed. *Recent advances in verocytotoxin-producing Escherichia coli infections*. Amsterdam: Elsevier Science, 1994; 33-36.

167. Caprioli A, Luzzi I, Rosmini F, Resti C, Edefonti A, Perfumo F, *et al.* Community-wide outbreak of hemolytic-uremic syndrome associated with non O157 verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *J Infect Dis* 1994; 169: 208-211.
168. Centers for Disease Control and Prevention. Community outbreak of hemolytic uremic syndrome attributable to *Escherichia coli* O111:NM- South Australia, 1995. *MMWR* 1995; 44: 550-558.
169. Centers for Disease Control and Prevention. Outbreak of acute gastroenteritis attributable to *Escherichia coli* serotype O104:H21-Helena, Montana South Australia, 1994. *MMWR* 1995; 44: 501-503.
170. Bielaszewska M, Srámkova L, Janda J, Bláhová K, Ambrozová H. Verotoxigenic (enterohaemorrhagic) *Escherichia coli* in infants and toddlers in Czechoslovakia. *Infection* 1990; 18: 352-356.
171. Blanco M, Blanco JE, Blanco J, Gonzalez EA, Alonso MP, Maas H, *et al.* Prevalence and characteristics of human and bovine verotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated in Galicia (north-western Spain). *Eur J Epidemiol* 1996; 12: 13-19.
172. Imberechts H, De Greve H, Lintermans P. The pathogenesis of edema disease in pigs. A review. *Vet Microbiol* 1992; 31: 221-223.
173. Tzipori S, Gunzer F, Donnenberg MS, De Montigny L, Kaper JB, Donohue -Rolfé A, The role of the *aeaA* gene in diarrhea and neurological complications in a gnotobiotic piglet model of enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection. *Infect Immun* 1995; 63: 3621-3627.
174. Paton AW, Voss E, Manning PA, Paton JC. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from cases of human disease show enhanced adherence to intestinal epithelial (Henle 407) cells. *Infect Immun* 1997; 65: 3799-3805.
175. Piérard D, Stevens D, Moriau L, Lior H, Lauwers S. Isolation and virulence factors of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* in human stool samples. *Clin Microbiol Infect* 1997; 3: 531-540.
176. Beutin L, Geier D, Steinruck H, Zimmermann S, Scheutz F. Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-like toxin)-producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy domestic animals. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 2483-2488.
177. Barret TL, Kaper JB, Jerse AE, Wachsmuth IK. Virulence factors in Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* isolated from humans and cattle. *J Infect Dis* 1992; 165: 979-980.
- 178a. Boerlin P, McEwen SA, Boerlin-Petzold F, Wilson JB, Johnson RP, Gyles CL. Associations between virulence factors of shiga toxin-producing *Escherichia coli* and disease in humans. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 497-503.
- 178b. Centers for Disease Control. Summary of notifiable diseases, United States 1993. *MMWR* 1994; 42: 1-12.
179. Todd EC. *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with ground beef and their control in Canada. *Can Commun Dis Rep* 2000; 26: 111-116.
180. Marné C, Puig A, Jovani A. *Escherichia coli* O157:H7 en la región del Maresme. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1990; 7: 465-466.



181. Gaztelurrutia L, Baron J, Prats G. Colitis hemorrágica causada por *E. coli* O157:H7 verotoxigénico. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1990; 8: 320-321.
182. Elcuaz R, Pena MJ, Canas A, García P, Prats G, Lafarga B. Gastroenteritis por *Escherichia coli* O157 productor de verotoxina. Presentación de dos casos. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1992; 10: 349-351.
183. Canut A, Brezmes MF, Prieto T, García T, Conde ML. Enteritis por *Escherichia coli* O157:H7 verotoxigénica. Estudio prospectivo de un año en Zamora. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1992; 10: 495.
184. Pedoby RG, Furtado C, Rojas A, McCartay N, Nysten G, Ruutu P *et al.* An international outbreak of vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 infection amongst tourists; a challenge for the European infectious disease surveillance network. *Epidemiol Infect* 1999; 123: 217-223.
185. McDonald C, Drew J, Carlson S, Dzogan S, Tataryn S, MacDonald A *et al.* Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 leading to the recall of retail ground beef-winnipeg, Manitoba, May 1999. *Canada Commun Dis Rep* 2000; 26: 109-111.
186. Rodrigue DC, Mast EE, Greene KD, Davis JP, Hutchinson MA, Wells JG. *et al.* A university outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with roast beef and an unusually benign clinical course. *J Infect Dis* 1995; 172: 1122-1135.
187. Slutsker L, Ries AA, Greene KD, Wells JG, Hutwagner L, Griffin PM, *et al.* *Escherichia coli* O157:H7 diarrhea in the United States: clinical and epidemiologic features. *Ann Intern Med* 1997; 126: 505-513.
188. Bokete TN, O'Callahan CM, Clausen CR, Tang NM, Tran N, Moseley SL *et al.* Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* in Seattle children: a prospective study. *Gastroenterology* 1993; 105: 1724-1731.
189. Park, CH, Gates KM, Vandell NM, Hixon DL. Isolation of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* (O157 and non O157) in a community hospital. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1996; 26: 69-72.
190. Griffin PM. Epidemiology of shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in humans in the United States. A: Kaper JB, O'Brien AD, ed. *Escherichia coli O157:H7 and other Shiga toxin-producing E. coli strains*. Washington DC: American Society for Microbiology, 1998: 15-22.
191. Waters JR, Sharp JCM, Dev VJ. Infection caused by *Escherichia coli* O157:H7 in Alberta, Canada, and in Scotland: a five year review, 1987-1991. *Clin Infect Dis* 1994; 19: 834-843.
192. Division of Disease Surveillance 1997. Notifiable Diseases Annual Summary 1995. *Canada Commun Dis Rep* 1997; 2359 (Suppl).
193. Bryant HE, Athar MA, Pai CH. Risk factors for *Escherichia coli* O157:H7 infection in an urban community. *J Infect Dis*, 1989; 160: 858-864.
194. Le Saux N, Spika JS, Friesen B, Johnson I, Melnychuk D, Anderson C, *et al.* Ground beef consumption in non-commercial settings is a risk factor for sporadic *Escherichia coli* O157:H7 infection in Canada. *J Infect Dis* 1993; 167: 500-502.

195. Rowe PC, Orrbine E, Lior H, Wells GA, McLaine PN, CPKDRC coinvestigators. Diarrhoea in close contacts as a risk factor for childhood haemolytic uraemic syndrome. *Epidemiol Infect* 1993; 110: 9-16.
196. Thomas A, Cheasty T, Frost JA, Chart H, Smith HR, Rowe B. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli*, particularly serogroup O157, associated with human infections in England and Wales: 1992-1994. *Epidemiol Infect* 1996; 117: 1-10.
197. Trevena WB, Willshaw GA, Cheasty T, Wray C, Gallagher J. Vero cytotoxin-producing *E. coli* O157 infection associated with farms. *Lancet* 1996; 347: 60-61.
198. Griffin PM, Bell BP, Cieslak PR, Tuttle J, Barrett TJ, Doyle MP, *et al.* Large outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections in the Western United States: the big picture. A: Karmali MA, Goglio AG, ed. *Recent advances in verocytotoxin-producing Escherichia coli Infections*. Nova York: Elsevier Science BV, 1994: 7-12.
199. Coia JE, Sharp JCM, Campbell DM, Curnow J, Ramsay CN. Environmental risk factors for sporadic *Escherichia coli* O157 infections in Scotland: results of a descriptive epidemiology study. *J Infect* 1998; 936: 317-321.
200. Parry SM, Salmon RL, Willshaw GA, Cheasty T. Risk factors for and prevention of sporadic infections with vero cytotoxin (shiga toxin) producing *Escherichia coli* O157. *Lancet* 1998; 351: 1019-1022.
201. MacDonald IA, Gould IM, Curnow J. Epidemiology of infection due to *Escherichia coli* O157: a three year prospective study. *Epidemiol Infect* 1996; 116: 279-284.
202. Trevena WB, Willshaw GA, Cheasty T, Domingue G, Wray C. Transmission of verocytotoxin producing *Escherichia coli* O157 infection from farm animals to humans in Cornwall and West Devon. *Commun Dis Public Health* 1999; 2: 263-268.
203. Milne LM, Plom A, Strudley I, Pritchard GC, Crooks R, Hall M *et al.* *Escherichia coli* O157 incident associated with a farm open to members of the public. *Commun Dis Public Health* 1999; 2: 22-26.
204. Wilson J, Spika J, Clarke R, McEwen S, Rahn K, Renwick S *et al.* Verocytotoxinogenic *Escherichia coli* infection in dairy families. *Canada Commun Dis Rep* 1998; 24: 17-20.
205. Rahn K, Renwick SA, Johnson RP, Wilson JB, Clarke RC, Alves D *et al.* Follow-up study of verotoxinogenic *Escherichia coli* infection in dairy farm families. *J Infect Dis* 1998; 177: 1139-1140.
206. Van de Kar NC, Roelofs HGR, Muyltjens HL, Tolboom JJM, Chart H, Monnens LAH. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* infection in patients with hemolytic uremic syndrome and their family-members in the Netherlands. A: Karmali MA, Goglio AG, ed. *Recent Advances in verocytotoxin-producing Escherichia coli infections*. Amsterdam: Elsevier Science BV, 1994: 5-48.
207. Allerberger F, Rossboth D, Dierich MP, Aleksic S, Schmidt H, Karch H. Prevalence and clinical manifestations of Shiga toxin producing *Escherichia coli* infections in Austrian children. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1996; 15: 545-550.

208. Amisano G, Caramello S, and Piovano P. *E. coli* O157 in milk filters in Italy. *EVC News 6 Not Ist Superiore Sanità* 1997; 10 (Supl.1): 3.
209. Caprioli A, Pezzella C, Morelli R, Giammanco A, Arista S, Crotti D, *et al.* Enteropathogens associated with childhood diarrhea in Italy. *Pediatr Infect Dis J.* 1996; 15: 876-883.
210. Cobeljic M, Lepsanovic Z, Velimorovic S. Infrequent finding of verotoxin-producing *Escherichia coli* in diarrheal stools in Belgrade, Serbia. *Scand J Infect Dis* 1995; 27: 427-428.
211. Dytoc MT, Ismaili A, Philpott DJ, Soni R, Brunton JL, Sherman PM. Distinct binding properties of *eaeA*-negative verocytotoxin-producing *Escherichia coli* of serotype O113:H21. *Infect Immun* 1994; 62: 3494-3505.
212. Gómez López A, Coperias Zazo JL, Díaz R, Ladrón de Guevara C. Incidence of *Escherichia coli* O157:H7 and other enteropathogens in a Spanish hospital. *Eur J Epidemiol* 2000; 16: 303-304.
213. Isaacson M, Canter PH, Effler P, Arntzen L, Bomans P, Heenan R. Hemorrhagic colitis epidemic in Africa. *Lancet* 1993; 341: 961.
214. Centers for Disease Control and Prevention. Foodborne Diseases Active Surveillance Network. *MMWR* 1996; 46: 258-261.
215. Strockbine N, Sowers E, Greene K, Hayes P, Griffin P, Wells J. Characterization of Shiga toxin-producing non-O157 *Escherichia coli* from the United States. 1983-1997. A: 3<sup>rd</sup> International Symposium and Workshop on Shiga Toxin (verocytotoxin)-Producing *Escherichia coli* Infections. Abstr. V235/III, 1997: 67.
216. Advisory Committee on the Microbiological Safety of food. Report on Verocytotoxin producing *Escherichia coli*. HMSO. Londres, 1995.
217. Michino H, Araki K, Minami S, Nakayama T, Ejima Y, Hiroe K *et al.* Recent outbreaks of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7 in Japan. A: Kaper JB, O'Brien AD. ed. *Escherichia coli O157:H7 and other Shiga toxin-producing E. coli strains*. Washington DC: ASM Press, 1998: 73-79.
218. Michino H, Draki K, Minami S, Takaya S, Sakai N, Miyakazi M *et al.* Massive outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection in schoolchildren in Sakai City, Japan, associated with consumption of white radish sprouts. *Am J Epidemiol* 1999; 150: 787-796.
219. Maermin JH, Griffin PM. Invited commentary: Public Health in crisis: outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections in Japan (comment). *Am J Epidemiol* 1999; 150: 797-803.
220. Martin DL, MacDonald KL, White KE, Soler JT, Osterholm MT. The epidemiology and clinical aspects of the hemolytic uremic syndrome in Minnesota. *N Engl J Med* 1990; 323: 1161-1167.
221. Spika JS, Khakhria R, Michel P, Milley D, Wilson J, Waters J. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections en Canada. A: Kaper JB, O'Brien AD, ed. *Escherichia coli O157:H7 and other Shiga toxin-producing E. coli strains*. Washington DC: ASM Press, 1998: 23-29.

222. Kleanthous H, Smith HR, Scotland SM, Gross RJ, Rowe B, Taylor CM *et al.* Haemolytic uraemic syndrome in the British Isles, 1985-8: association with Verocytotoxin producing *Escherichia coli*. Part 2. Microbiological aspects. *Arch Dis Child* 1990; 65: 722-727.
223. Ministère du Travail et des Affaires Sociales. Direction Générale de la Santé. Surveillance du Syndrome hemolytique et uremique chez les enfants de moins de 15 anys en 1996. *Bull Epidemiol Hebdom* 1998; núm. esp.: 43-44.
224. Lopéz EL, Contrini MM, De Rosa MF. Epidemiology of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in South America. A: Kaper JB, O'Brien AD ed. *Escherichia coli O157:H7 and other Shiga toxin-producing E. coli strains*. Washington DC: ASM Press, 1998; 30-37.
225. López EL, Contrini MM, Devoto S, De Rosa MF, Grana MG, Aversa L, *et al.* Incomplete hemolytic uremic syndrome in Argentinean children with bloody diarrhea. *J Pediatr* 1995; 127: 364-367.
226. Ikeda K, Ida O, Kimoto K, Takatorige T, Nakanishi N, Tataru K. Predictors for the development of hemolytic uremic syndrome with *Escherichia coli* O157:H7 infections with focus on the day of illness. *Epidemiol Infect Dis* 2000; 124: 343-349.
227. López EL, Díaz M, Grinstein S, Devoto S, Mendilaharsu F, Murray BE, *et al.* Hemolytic uremic syndrome and diarrhea in Argentine children: the role of Shiga-like toxins. *J Infect Dis* 1989; 160: 469-475.
228. López EL, Díaz M, Devoto S, Grinstein S, Woloj M, Murray BE, *et al.* Evidence of infection with organisms producing Shiga-like toxins in household contacts of children with hemolytic uremic syndrome. *Pediatr Infect Dis* 1991; 10: 20-24.
229. Heuvelink AE, Van den Biggelaar FL, De Boer E, Herbes RG, Melchers WJ, Huis in't Veld JH, Monnens L. Isolation and characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 strains from Dutch cattle and sheep. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 878-882.
230. ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods). *Escherichia coli* patógeno intestinal. A: ICMSF, ed. *Microorganismos de los alimentos. Características de los patógenos microbianos*. Saragossa: Acribia SA, 1998; 147-164.
231. Chapman PA, Siddons CA, Wright DJ, Norman P, Fox J, Crick E. Cattle as a possible source of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 infections. *Epidemiol Infect* 1993; 111: 439-447.
232. Blanco M, Blanco JE, Blanco J, González EA, Mora A, Padro C *et al.* Prevalence and characteristics of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and other verotoxin-producing *E. coli* in healthy cattle. *Epidemiol Infect* 1996; 117: 251-257.
233. Blanco M, Blanco JE, Blanco J, Mora A, Pardo C, Alonso MP *et al.* Distribution and characterization of faecal verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) isolated from healthy cattle. *Vet Microbiol* 1997; 54: 309-319.
234. Brown CA, Harmon BG, Zhao T, Doyle MP. Experimental *Escherichia coli* O157:H7 carriage in calves. *Appl Environ Microbiol* 1997; 63: 27-32.

235. Pradel N, Livrelli V, De Champs C, Palcoux JB, Reynaud A, Scheutz F. Prevalence and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle, food, and children during a one-year prospective study in France. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 1023-1031.
236. Kudva IT, Hatfield PG, Hovde CJ. Characterization of *Escherichia coli* O15:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* serotypes isolated from sheep. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 892-899.
237. Chapman PA, Siddons CA, Gerdan Malo AT, Harkin MA. A 1-year study of *Escherichia coli* O157 in cattle, sheep, pigs and poultry. *Epidemiol Infect* 1997; 119: 245-250.
238. Heuvelink AE, Zwartkruis-Nahuis JT, van den Biggelaar FL, van Leeuwen WJ, de Boer E. Isolation and characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 from slaughter pigs and poultry. *Int J Food Microbiol* 1999; 52: 67-75.
239. Hancock DD, Besser TE, Rice DH. Ecology of *Escherichia coli* O15:H7 in cattle and impact of management practices. A: Kaper JB, O'Brien AD, ed. *Escherichia coli O15:H7 and other Shiga toxin producing E. coli strains*. Washington DC: ASM Press, 1998: 85-91.
240. Louie M, Read S, Louie L, Ziebell K, Rahn K, Borczyk A, et al. Molecular typing methods to investigate transmission of *Escherichia coli* O157:H7 from cattle to humans. *Epidemiol Infect* 1999; 123: 17-24.
241. Hancock DD, Besser TE, Rice DH, Ebel ED, Herriot DE, Carpenter LV. Multiple sources of *Escherichia coli* O157 in feedlots and dairy farms in the northwestern USA. *Prev Vet Med* 1998; 35: 11-19.
242. Rasmussen MA, Cray WC, Casey TA, Whipp SC. Rumen contents as a reservoir of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* 1993; 114: 79-84.
243. Zhao T, Doyle MP, B Harmon BG, Brown CA, Eric Mueller PO, Parks AH. Reduction of carriage of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in cattle by inoculation with probiotic bacteria. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 641-647.
244. Cray CW, Moon HW. Experimental infection of calves and adult cattle with *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol* 1995; 61: 1586-1590.
245. Shere JA, Bartlett KJ, Kaspar CW. Longitudinal study of *Escherichia coli* O157:H7 dissemination on four dairy farms in Wisconsin. *Appl Environ Microbiol* 1998; 64: 1390-1399.
246. Besser TE, Hancock DD, Pritchett LC, McRae EM, Rice DH, Tarr PI. Duration of detection of fecal excretion of *Escherichia coli* O157:H7 in cattle. *J Infect Dis* 1997; 175: 726-729.
247. Garber LP, Wells SJ, Hancock DD, Doyle MP, Shere JA, Zhao T. *Escherichia coli* O157:H7 in dairy heifers: results of a case-control study. *J Am Vet Med Assoc* 1995; 207: 46-47.
248. Hancock DD, Rice DH, Herriott DE, Besser TE, Ebel ED, Carpenter LV. Effects of farm manure handling practices on *Escherichia coli* O157 prevalence in cattle. *J Food Prot* 1997; 60: 363-366.

249. Hancock DD, Rice DH, Thomas LA, Dargatz DA, Besser TE. Epidemiology of *Escherichia coli* O157 in feedlot cattle. *J Food Prot* 1997; 60: 462-465.
250. Hancock DD, Besser TE, Rice DH, Herriott DE, Tarr PI. Longitudinal study of *Escherichia coli* O157 in fourteen cattle herds. *Epidemiol Infect* 1997; 118: 193-195.
251. Zhao T, Doyle MP, Shere J, Garber L. Prevalence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in a survey of dairy herds. *Appl Environ Microbiol* 1995; 61: 1290-1293.
252. Dorn CR, Angrick EJ. Serotype O157:H7 *Escherichia coli* from bovine and meat sources. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 1225-1231.
253. Garber L P, Wells SJ, Hancock DD, Doyle MP, Tuttle J, Shere JA, et al. Risk factors for fecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy calves. *J Am Vet Med Assoc* 1995; 207:46-49.
254. Davies CM, Long JA, Donald M, Ashbolt NJ. Survival of fecal microorganisms in marine and freshwater sediments. *Appl Environ Microbiol* 1995; 61:1888-1896.
255. Cray WC Jr, Casey TA, Bosworth BT, Rasmussen MA. Effect of dietary stress on fecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in calves. *Appl Environ Microbiol* 1998; 64:1975-1979.
256. Hovde CJ, Austin PR, Cloud KA, Willians CG, Hunt CW. Effect of cattle diet on *Escherichia coli* O157:H7 acid resistance. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65:3233-3235.
257. Heuvelink AE, van de Kar NC, Meis JF, Monnens LA, Melchers WJ. Characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 isolates from patients with haemolytic syndrome in Western Europe. *Epidemiol Infect* 1995; 115: 1-14.
258. Vold L, Klugseth Johansen B, Kruse H, Skjerve E, Wasteson Y. Occurrence of shiga toxinogenic *Escherichia coli* O157 in Norwegian cattle herds. *Epidemiol Infect* 1998; 120: 21-28.
259. Weber A, Klie H, Richter H, Gallien P, Timm M, Perlberg KW. Present problems in detection of sources of infection and chains of infection with enterohemorrhagic *E. coli*. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 1997; 110: 211-213.
260. Kudva IT, Hatfield PG, Hovde CJ. *Escherichia coli* O157:H7 in microbial flora of sheep. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 431-433.
261. Rice DH, Hancock DD, Besser TE. Verotoxigenic *E. coli* O157 colonisation of wild deer and range cattle. *Vet Rec* 1995; 137: 524.
262. Chin J, ed. Control of communicable diseases manual. 17a ed. Washington: American Public Health Association, 2000.
263. Acheson DWK, Teusch GT. Diarrhea and dysentery causing *Escherichia coli* A: Feigin RD, Cherry JD, ed. *Textbook of Pediatric Infectious Diseases*, 4a ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 1998: 1282-1298.
264. Chapman PA, Cowden J, Curnow J, Gross R, Hutchinson D, Painter M, et al. Communicable Disease Surveillance Centre. Interim guidelines for the control of infections with verocytotoxin producing *Escherichia coli* (VTEC). *Commun Dis Rep Rev* 1995; 5: R77-R81.

265. Bielaszewska M, Janda J, Blahova K, Minarikova H, Jikova E, Karmali MA, et al. Human *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with the consumption of unpasteurized goat's milk. *Epidemiol Infect* 1997; 119: 299-305.
266. Keene WE, Hedberg K, Herriott DE, Hancock DD, MacKay RW, Barrett TJ, et al. A prolonged outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections caused by commercially distributed raw milk. *J Infect Dis* 1997; 176: 815-818.
267. Tuttle J, Gomez T, Doyle MP, Wells JG, Zhao T, Tauxe RV, Griffin PM. Lessons from a large outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections: insights into the infectious dose and method of widespread contamination of hamburger patties. *Epidemiol Infect* 1999; 122: 185-192.
268. Tilden J, Young W, McNamara AM, Custer C, Boesel B, Lambert-Fair MA, et al. A new route of transmission for *Escherichia coli*: infection from dry fermented salami. *Am J Public Health* 1996; 86: 1142-1145
269. Swerdlow DL, Griffin PM. Duration of faecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 among children in day-care centres. *Lancet* 1997; 349: 4-7.
- 270a. Shah S, Hoffman R, Shillam P, Wilson B. Prolonged fecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 during an outbreak at a day care center. *Clin Infect Dis* 1996; 23: 835-886.
- 270b. Shah S, Hoffman R, Shillam P, Wilson B. Prolonged fecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 during an outbreak at a day care center. *Clin Infect Dis* 1996; 23: 835-6.
271. Belongia EA, Osterholm MT, Soler JT, Ammend DA, Braun JE, McDonald KL. Transmission of *Escherichia coli* O157:H7 infection in Minnesota child day-care facilities. *JAMA* 1993; 296: 883-888.
- 272a. Karch H, Rusmann H, Schmidt H, Schwarzkopf A, Heesemann J. Long-term shedding and chonal turnover of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 in diarrheal disease. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 1602-1605.
- 272b. Carter AO, Borczyk AA, Carlson JAK, Harvey B, Hockin JC, Karmali MA, et al. A severe outbreak of *Escherichia coli* O157:H7-associated hemorrhagic colitis in a nursing home. *N Engl J Med* 1987; 317: 1496-1500.
273. Boyce TG, Swerdlow DL, Griffin PM. Current concepts: *Escherichia coli* O157:H7 and the hemolytic uremic syndrome. *N Engl J Med* 1995; 333: 364-368.
274. Watanabe H, Guerrant RL. Summary: Nagasaki enterohemorrhagic *Escherichia coli* Meeting and Workshop. *J Infect Dis* 1997; 176: 247-249.
275. Rowe PC, Orrbine EE, Lior H, Wells GA, McLaine PN. A prospective study of exposure to verotoxin-producing *Escherichia coli* among Canadian children with haemolytic uraemic syndrome. *Epidemiol Infect* 1993; 110: 1-7.
276. Laboratory Center for Disease Control. Outbreak of gastrointestinal disease-Ontario. *Canada Commun Dis Rep* 1987; 13: 5-8.
277. Marsh J, MacLeod AF, Hanson MF, Emmanuel FXS, Frost JA, Thomas A. A restaurant-associated outbreak of *E coli* O157 infection. *J Public Health Med* 1992; 14: 78-83

278. Tarr PI, Neill MA, Clausen CR, Watkins SL, Christie DL, Hickman RO. *Escherichia coli* O157:H7 and the hemolytic uremic syndrome: importance of early cultures in establishing the etiology. *J Infect Dis* 1990; 162: 553-6
279. Bell BP, Griffin PM, Lozano P, Christie DL, Kobayashi JM, Tarr PI. Predictors of hemolytic uremic syndrome in children during a large outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections. *Pediatrics* 1997; 100: 127 (E12).
280. Wall PG, McDonnell RJ, Adak GK, Cheasty T, Smith HR, Rowe B. General outbreaks of verocytotoxin producing *Escherichia coli* O157 in England and Wales from 1992 to 1994. *Commun Dis Rep Rev* 1996; 6: R 26-33.
281. Bell BP, Goldoft M, Griffin PM, Davis MA, Gordon DC, Tarr PI, et al. A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7-associated bloody diarrhea and hemolytic uremic syndrome from hamburgers: the Washington experience. *JAMA* 1994; 272: 1349-1353.
282. Swerdlow DL, Woodruff BA, Brady RC, Griffin PM, Tippen S, Donnell HD, et al. A waterborne outbreak in Missouri of *Escherichia coli* O157:H7 associated with bloody diarrhea and death. *Ann Intern Med* 1992; 117: 812-819.
283. Boyce TG, Pemberton AG, Wells JG, Griffin PM. Screening for *Escherichia coli* O157:H7- a nationwide survey of clinical laboratories. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 3275-3277.
284. Griffin PM, Olmstead LC, Petras RE. *Escherichia coli* O157:H7-associated colitis: a clinical and histological study of 11 cases. *Gastroenterology* 1990; 99:142-149.
285. Case Records of the Massachusetts General Hospital (Case 25-1994). *N Engl J Med* 1994; 330: 1811-1817.
286. Cimolai N, Carter JE, Morrison BJ, Anderson JD. Risk factors for the progression of *Escherichia coli* O157:H7 enteritis to hemolytic-uremic syndrome. *J Pediatr* 1990; 116: 1496-1500.
287. Tarr PI, Neill MA, Allen J, Siccardi CJ, Watkins SL, Hickman RO. The increasing incidence of the hemolytic-uremic syndrome in King County, Washington: lack of evidence for ascertainment bias. *Am J Epidemiol* 1989; 129: 582-586.
288. Thomas B, Swerdlow DL, Griffin PM. Current concepts: *Escherichia coli* O157:H7 and the hemolytic-uremic syndrome. *N Engl J Med* 1995; 333: 364-368.
289. Karch H, Böhm H, Schmidt H, Gunzer F, Aleksic S, Heesemann J. Clonal structure and pathogenicity of Shiga-like toxin –producing, sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157:H-. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 1200-1205.
290. Ratnam S, March SB, Ahmed R, Bezanson GS, Kasatiya S. Characterization of *Escherichia coli* serotype O157:H7. *J Clin Microbiol* 1988; 26: 2006-2012.
291. Thompson JS, Hodge DS, Borczyk AA. Rapid biochemical test to identify verocytotoxin-positive strains of *Escherichia coli* serotype O157. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 2165-2168.
292. March SB, Ratnam S. Sorbitol-MacConkey medium for detection of *Escherichia coli* O157:H7 associated with hemorrhagic colitis. *J Clin Microbiol* 1986; 23: 869-872.



293. Zadik PM, Chapman PA, Siddons CA. Use of tellurite for the selection of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157. *J Med Microbiol* 1993; 39: 155-158.
294. Chapman PA, Siddons CA, Zadik PM, Jewes L. An improved selective medium for the isolation of *Escherichia coli* O157. *J Med Microbiol* 1991; 35: 107-110.
295. Okrend AJG, Rose BE, Lattuada CP. Use of 5-bromo-4-chloro-3-indoxyl- $\beta$ -D- glucuronide in MacConkey sorbitol agar to aid in the isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from ground beef. *J Food Prot* 1990; 53: 941-943.
296. Bolton FJ, Crozier L, Williamson JK. Optimisation of methods for the isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from beefburgers . *PHLS Microbiol Dig* 1995; 12: 67-70.
297. Hinde M, Bolton EJ, Wright PA, Durband CA. Improved detection of verotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 in faecal samples by enrichment culture. *PHLS Microbiol Dig*. 1995; 12: 71-73.
298. Sanderson MW, Gay JM, Hancock DD, Gay CC, Fox LK, Besser TE. Sensitivity of bacteriologic culture for detection of *Escherichia coli* O157:H7 in bovine feces. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2616-2619.
299. Chapman PA, Siddons CA. A comparison of immunomagnetic separation and direct culture for the isolation of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 from cases of bloody diarrhoea, non bloody diarrhoea and asymptomatic contacts. *J Med Microbiol* 1996; 44: 267-271.
300. Wright D, Chapman PA, Siddons CA. Immunomagnetic separation as a sensitive method for isolating *Escherichia coli* O157 from food samples. *Epidemiol Infect* 1994; 113: 31-39.
301. Karch H, Janetzki-Mittmann C, Aleksic S, Datz M. Isolation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains from patients with haemolytic-uremic syndrome by using immunomagnetic separation, DNA-based methods, and direct culture. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 516-519.
302. Cubbon MD, Coia JE, Hanson MF, Thomson-Carter FM. A comparison of immunomagnetic separation, direct culture and polymerase chain reaction for the detection of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in human faeces. *J Med Microbiol* 1996. 44:219-222.
303. Hansen W, Yourassowsky E. Detection of  $\beta$ -glucuronidase in lactose-fermenting members of the family *Enterobacteriaceae* and its presence in bacterial urine cultures. *J Clin Microbiol* 1984; 20:1177-1179.
304. Bielaszewska M, Janda J, Bláhová K, Karch H, Karmali MA, Preston MA, *et al*. Isolation of sorbitol-fermenting (SF) verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H- in the Czech Republic, abstr V9/1, p1. A: 3rd International Symposium and Workshop on Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* infection. Lois Joi Galler Foundation for Hemolytic Uremic Syndrome Inc, Melville, Nova York, 1997.
305. Karmali MA. Laboratory diagnosis of verotoxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clin Microbiol Newsl* 1987; 9: 65-70.
306. Farmer III. *Enterobacteriaceae*. Introduction and identification. A: Murray P, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH, ed. *Manual of Clinical Microbiology*, 7a ed. Washington DC: ASM; 1999: 432-458.

307. Kehl KS, Havens P, Behnke CE, Acheson DW. Evaluation of the Premier EHEC assay for detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 2051-2054.
308. Beutin L, Zimmermann S, Gleier K. Rapid detection and isolation of Shiga-like toxin (verocytotoxin)- producing *Escherichia coli* by direct testing of individual enterohemolytic colonies from washed sheep blood agar plates in the VTEC-RPLA assay. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 2812-2814.
309. Begum D, Strockbine NA, Sowers EG, Jakson MP. Evaluation of a technique for identification of Shiga-like toxin –producing *Escherichia coli* by using polymerase chain reaction and digoxigenin –labeled probes. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 3153-3156.
310. Olvisk O, Strockbine NA. PCR detection of heat-stable, heat –labile and shiga-like toxin genes in *Escherichia coli*. A: Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ, ed. *Diagnostic Molecular Microbiology. Principles and applications*. American Society of Microbiology. 1993; 271-276
311. Brian MJ, Frosolono M, Murray BE, Miranda A, López EL, Gómez HF, et al. Polymerase chain reaction for diagnosis of enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection and hemolytic-uremic syndrome. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 1801-1806.
312. Pollard DR, Johnson WM, Lior H, Tyler SD, Rozee KR. Rapid and specific detection of verotoxin genes in *Escherichia coli* by the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 540-545.
313. Gannon VPJ, King RK, Kim JY, Thomas EJ. Rapid and sensitive method for detection of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* in ground beef by using the polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol* 1992; 58: 3809-3815.
314. Johnson WM, Pollard DR, Lior H, Tyler SD, Rozee KR. Differentiation of genes coding for *Escherichia coli* verotoxin 2 and verotoxin associated with porcine edema disease (Vte) by the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 2351-2353.
315. Karch H, Meyer T. Single primer pair for amplifying segments of distinct Shiga-like toxin genes by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 2751-2757.
316. Paton AW, Paton JC, Goldwater PN, Manning PA. Direct detection of *Escherichia coli* Shiga-like toxin genes in primary fecal cultures by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 3063-3067.
317. Read SC, Clarke RC, Martin A, De Grandis SA, Hii J, McEwen S, Gyles CL. Polymerase chain reaction for detection of verocytotoxigenic *Escherichia coli* isolated from animal and food sources. *Mol Cell Probes* 1992; 6: 153-161.
318. Lin Z, Kurazono H, Yamasaki S, Takeda Y. Detection of various variant verotoxin genes in *Escherichia coli* by polymerase chain reaction. *Microbiol Immunol* 1993; 37: 543-548.
319. Russmann H, Schmidt H, Heesemann J, Caprioli A, Karch H. Variants of Shiga-like toxin II constitute a major toxin component in *Escherichia coli* O157 strains from patients with haemolytic uraemic syndrome. *J Med Microbiol* 1994; 40: 338-343.

320. Tyler SD, Johnson WM, Lior H, Wang G, Rozee KR. Identification of verotoxin type 2 variant B subunit genes in *Escherichia coli* by the polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 1339-1343.
321. Ramotar K, Waldhart B, Church D, Szumski R, Louie TJ. Direct detection of verotoxin-producing *Escherichia coli* in stool samples by PCR. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 519-524.
322. Begum D, Jackson MP. Direct detection of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* in ground beef using the polymerase chain reaction. *Mol Cell Probes* 1995; 9: 259-264.
323. Paton AW, Paton JC, Goldwater PN, Heuzenroeder MW, Manning PA. Sequence of a variant Shiga-like toxin type-I operon of *Escherichia coli* O111:H-. *Gene* 1993; 129: 87-92.
324. Yu J, Kaper J. Cloning and characterization of the *eae* gene of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Mol Microbiol* 1992; 6: 411-417.
325. Fratamico PM, Sackitey SK, Wiedmann M, Deng MY. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 by multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2188-2191.
326. Gannon VPJ, D'Souza S, Graham T, King RK, Rahn K, Read S. Use of the flagellar H7 gene as a target in multiplex PCR assays and improved specificity and identification of enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 656-662.
327. Gannon VPJ, Rashed M, King RK, Thomas EJG. Detection and characterization of the *eae* gene of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* by using polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 1268-1274.
328. Cebula TA, Payne WL, Freng P. Simultaneous identification of strains of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and their Shiga-like toxin type by mismatch amplification mutation assay-multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 248-250.
329. Paton AW, Paton JC. Detection and characterization of Shiga toxicogenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx*<sub>1</sub>, *stx*<sub>2</sub>, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli hlyA*, *rfb*<sub>O111</sub>, and *rfb*<sub>O157</sub>. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 598-602.
330. Beutin L, Montenegro MA, Orskov I, Orskov F, Prada J, Zimmermann S, *et al.* Close association of verotoxin (Shiga-like toxin) production with enterohemolysin production in strains of *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 2559-2564.
331. Bettelheim KA. Identification of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* by means of their production of enterohaemolysin. *J Appl Bacteriol* 1995; 79: 178-180.
332. Beebakhee G, Louie M, De Azavedo J, Brunton J. Cloning and nucleotide sequence of the *eae* gene homologue from enterohemorrhagic *Escherichia coli* serotype O157:H7. *FEMS Microbiol Lett* 1992; 91: 63-68.
333. Padhye NV, Doyle MP. Rapid procedure for detecting enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in food. *Appl Environ Microbiol* 1991; 57: 2693-2698.

334. Ahmed R, Bopp C, Borczyk A, Kasatiya S. Phage-typing schema for *Escherichia coli*. *J Infect Dis* 1987; 155: 806-809.
335. Khakhria R, Duck D, Lior H. Extended phage-typing schema for *Escherichia coli* O157:H7. *Epidemiol Infect* 1990; 105: 511-520.
336. Strockbine NA, Wells JG, Bopp CA, Barrett TJ. Overview of detection and subtyping methods. A: Kaper JB, O'Brien AD, ed. *Escherichia coli O157:H7 and other Shiga toxin-producing E. coli strains*. Washington DC: ASM Press, 1998: 331-356.
337. Barrett TJ, Lior H, Green JH, Khakhria R, Wells JG, Bell BP *et al*. Laboratory investigation of a multistate food-borne outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 by using pulsed-field gel electrophoresis and phage typing. *J Clin Microbiol* 1994; 32:3013-3017.
338. Krause U, Thomson-Carter FM, Pennington TH. Molecular epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 by pulsed-field gel electrophoresis and comparison with that by bacteriophage typing. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 959-961.
339. Martin IE, Tyler SD, Tyler KD, Khakhria R, Johnson WM. Evaluation of ribotyping as epidemiologic tool for typing *Escherichia coli* serogroup O157 isolates. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 720-723.
340. Tyler KD, Wang G, Tyler SD, Johnson WM. Factors affecting reliability and reproductibility of amplification-based DNA fingerprinting of representative bacterial pathogens. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 339-346
341. Swaminathan B, Barrett TJ. Amplification methods for epidemiologic investigations of infectious diseases. *J Microbiol Methods* 1995; 23: 129-139.
342. Birch M, Denning DW, Law D. Rapid genotyping of *Escherichia coli* O157:H7 isolates by random amplification of polymorphic DNA. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1996; 15: 297-302.
343. Madico G, Akopyants NS, Berg DE. Arbitrarily primed PCR DNA fingerprinting of *Escherichia coli* O157:H7 strains by using templates from boiled cultures. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 1534-1536.
344. Böhm H, Karch H. DNA fingerprint of *Escherichia coli* O157:H7 strains by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 2169-2172.
345. Izumiya H, Terajima J, Wada A, Inagaki Y, Itoh KI, Tamura K, Watanabe H. Molecular typing of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 isolates in Japan by using pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 1675-1680.
346. Bender JB, Hedberg CW, Besser JM, Boxrud DJ, MacDonald KL, Osterholm MT. Surveillance for *Escherichia coli* O157:H7 infections in Minnesota by molecular subtyping. *N Engl J Med* 1997; 337: 388-394.
347. Stephenson J. New approaches to detecting and curtailing foodborne microbial infections. *JAMA* 1997; 277: 1337-1340.
348. Tauxe RV. Strategies for surveillance and prevention. *Lancet* 1998; 352: (suppl IV): 10.

349. Behrman RE, Kliegman RM, ed. Nelson. *Compendio de Pediatría*. 3a ed. Madrid: McGraw Hill Interamericana, 1999.
350. Sandhu BK, Isolauri E, Walker-Smith JA, Banchini G, Van Caillie-Bertrand M, Dias JA, *et al.* A multicentre study on behalf of the European Society of Paediatric Gastroenterology and Nutrition. Working group on acute diarrhoea. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1997; 24: 522-527.
351. Cimolai N, Basalyga S, Mah DG, Morrison BJ, Carter JE. A continuing assessment of risk factors for the development of *Escherichia coli* O157:H7 associated hemolytic uremic syndrome. *Clin Nephrol* 1994; 42: 85-89.
352. Cimolai N, Morrison JB, Carter JE. Risk factors for the central nervous system manifestations of gastroenteritis associated hemolytic uremic-syndrome. *Pediatrics* 1992; 90: 616-621.
353. Bell BP, Griffin P, Lozano P, Christie D, Kobayashi J, Tarr P. Predictor of hemolytic uremic syndrome in children during a large outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections. *Pediatrics* 1997; 100: 127.
354. Boyce TG, Swerdlow DL, Griffin PM. *Escherichia coli* O157:H7 and the hemolytic-uremic syndrome. *N Engl J Med* 1995; 333: 364-368.
355. Griffin PM. *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohemorrhagic *Escherichia coli*. A: Blaser MJ, Smith PD, Ravdin JI, Greenberg HB, Guerrant RL, ed. *Infection of the gastrointestinal tract*. Nova York: Raven Press 1995: 739-761.
356. Robson W, Scott R, Rick G. influence of antidiarrhea and antimicrobial medication on the hemorrhagic colitis associated with hemolytic-uremic syndrome. *J Pediatr* 1990; 17: 675-676.
357. Ostroff SM, Kobayashi JM, Lewis JH. Infections with *Escherichia coli* O157:H7 in Washington State; the first year of statewide disease surveillance. *JAMA* 1989; 262: 355-359.
358. Ikeda K, Ida O, Kimoto K, Takatorige T, Nakanishi N, Tatara K. Effect of early fosfomicin treatment on prevention of hemolytic uremic syndrome accompanying *Escherichia coli* O157:H7 infection. *Clin Nephrol* 1999; 52: 357-362.
359. Proulx F, Turgeon JP, Delage G, Lafleur L, Chicoine L. Randomized, controlled trial of antibiotic therapy for *Escherichia coli* O157:H7 enteritis. *J Pediatr* 1992; 121: 299-303.
360. Bell BP, Goldoft M, Griffin P, Davis M, Gordon D, Tarr P, *et al.* A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7-associated bloody diarrhea and hemolytic uremic syndrome from hamburgers. *JAMA* 1994; 272: 1349-1353.
361. Karch H, Stockbine N, O'Brien A. Growth of *Escherichia coli* in the presence of trimethoprim-sulfamethoxazole facilitates detection of Shiga-like toxin producing strains by colony blot assay. *FEMS Microbiol Lett* 1986; 35: 141-145.
362. Walterspiel JN, Ashkenazi S, Morrow AL, Cleary TG. Effect of the subinhibitory concentrations of antibiotics on extra-cellular Shiga-like toxin 1. *Infection*. 1992; 20: 25-29.

363. Thomson PD. HUS in Johannesburg, South Africa. A: Kaplan BS, Trompeter RS, Moake JL, ed. *Hemolytic Uremic Syndrome and Thrombotic Thrombocytopenic Purpura*. Nova York: Marcel Dekker Inc, 1992: 79-88.
364. Siegler RL. The hemolytic uremic syndrome. *Pediatr Clin North Am* 1995; 42: 1505-1529.
365. Seigler R, Milligan M, Burninham T, Christofferson R, Chang S, Jorde L. Long-term outcome and prognostic indicators in the hemolytic-uremic syndrome. *J Pediatr* 1991; 118: 195-200.
366. Hahn J, Havens P, Higgens J, O'Rourke P, Strand R. Neurological complications of the hemolytic-uremic syndrome. *J Child Neurol* 1989; 4: 108-113.
367. Cimolai N, Anderson JD, Bhanji NM, Chen L, Blair GK. *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with perforated appendicitis and chronic diarrhoea. *Eur J Pediatr* 1990; 149: 259-260.
368. WHO Consultation on the Prevention and Control of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC). Ginebra, 1977. URL: <http://www.who.int/fsf/ehec.htm>
369. Bradley DE, Howard SP, Lior H. Colicinogeny of O157:H7 enterohemorrhagic *Escherichia coli* and the shielding of colicin and phage receptors by their O antigenic side chains. *Can J Microbiol* 1991; 37: 97-104.
370. *Escherichia coli* O157:H7. WHO information. Fact Sheet núm. 125 (juliol 1996). URL: <http://www.who.int/inf-fs/en/fact125.html>
371. Doyle MP, Schoeni JL. Survival and growth characteristics of *Escherichia coli* associated with hemorrhagic colitis. *Appl Environ Microbiol* 1984; 48: 855-856.
372. Shu-Er Yang, Cheng-Chun Chou. Growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in egg products held at different temperatures. *J Food Prot* 763; 7: 907-911.
373. Quinto EJ, Bachouri M, Roig AX i Mora MT. Evolución de *Escherichia coli* enterohemorrágico en yogur comercial. *Alimentaria* 1999; 299: 33-35.
374. Preventing foodborne illness: *Escherichia coli* O157:H7. National Center of Infectious Diseases (NCID).  
URL: [http://www.cdc.gov/ncidod/publications/brochures/e\\_coli.htm](http://www.cdc.gov/ncidod/publications/brochures/e_coli.htm)
375. Summary of outbreaks of *Escherichia coli* O157 and other Shiga-toxin producing *E. coli* reported to the CDC in 1999. Summary of 1999 data.  
URL: [http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/escherichiacoli\\_a.htm](http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/escherichiacoli_a.htm)
376. Report of WHO Working Group Meeting on "Shiga-like toxin producing *Escherichia coli* (SLETC), with emphasis on zoonotic aspects". Bèrgam, Itàlia, 1 de juliol de 1994. Doc. WHO/CDS/VPH/94.136.  
URL: [http://www.who.int/emc/diseases/zoo/vphpublications/ehec\\_stc.html](http://www.who.int/emc/diseases/zoo/vphpublications/ehec_stc.html)
377. Hygiene in food-service and mass catering establishments: important rules. Ginebra: WHO, 1994 (WHO/FNU/FOS/94.5)

378. Safe Food Handling - A guide for managers of Food Service Establishments by M. Jacob Ginebra: WHO, 1989.
379. Heat Surveillance and Management Procedures for Food-Handling Personnel of a WHO Consultation. Technical Report Series, Nº 785, 1989 (ISBN 92 4 120785 X). URL: <http://www.who.int/dsa/cat98/food8.htm>
380. WHO Consultation on the prevention and control of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) infections, Geneva, Switzerland, 28 April-1 May 1997 (WHO/FSF/FOS/97.6) URL: <http://www.who.int/fsf/ehec/htm>
381. Buchanan RL, Edelson SG. pH-dependent stationary-phase acid resistance response of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in the presence of various acidulants. *J Food Prot* 1999; 62: 211-218.
382. Duffy G, Riordan DCR, Sheridan JJ, Call JE, Whiting RC, Blair IR, McDowell DA. Effect of pH on survival, thermotolerance, and verotoxin production of *Escherichia coli* O157:H7 during simulated fermentation and storage. *J Food Prot* 2000; 63: 12-18.
383. Ryu JH, Beuchat LR. Changes in heat tolerance of *Escherichia coli* O157:H7 after exposure to acidic environments. *Food Microbiol* 1999; 16: 317-324.
384. Thermometer use for cooking ground beef patties. Key facts 11-08-98. Food Safety and Inspection Service (FSIS). United States Department of Agriculture, Washington DC. Media Communications Office. URL: <http://www.fsis.usda.gov/OA/news/colorpr.htm>
385. D'Aoust JY, Park CE, Szabo RA, Todd ECD, Emmons DB, McKellar RC. Thermal inactivation of *Campylobacter* species, *Yersinia enterocolitica*, and hemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in fluid milk. *J Dairy Sci* 1988; 71: 3230-3236.
386. Wang G, Zhao T, Doyle MP. Fate of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in bovine feces. *Appl Environ Microbiol* 1996; 62: 2567-2570.
387. Kobayashi M, Sasaki T, Saito N, Tamura K, Suzuki K, Watanabe H, Agui N. Houseflies: not simple mechanical vectors of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Am J Trop Med Hyg* 1999. 61: 625-629.
388. Ackers M, Mahon JB, Leahy E, Damrow T, Hutwagner. An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with leaf lettuce consumption, Western Montana. A: 36<sup>th</sup> Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Washington, DC: American Society for Microbiology.; Abstr K43, 1996: 258.
389. Mermin J, Mead PS, Gensheimer K, Griffin P. Outbreak of *E. coli* O157:H7 infections among Boy Scouts in Maine., A: 36<sup>th</sup> Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Sept. 15-18, Washington, DC: American Society for Microbiology; Abstr K44, 1996: 258.
390. Besser RE, Lett SM, Weber JT, Doyle MP, Barret TJ, Wells JG, Griffin PM. An outbreak of diarrhoea and haemolytic uremic syndrome from *Escherichia coli* O157:H7 in fresh-pressed apple cider. *JAMA* 1993; 269: 2217-2220.

391. Zhao T, Doyle MP, Besser RE. Fate of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in apple cider with and without preservatives. *Appl Environ Microbiol* 1993; 59: 2526-2530.
392. Centers for Disease Control and Prevention. Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with drinking unpasteurized commercial apple juice - Brititsh Columbia, California, Colorado and Washington. *MMWR* 1996; 45: 975.
393. Steele BT, Murphy N, Rance CP. An outbreak of hemolytic uremic syndrome associated with ingestion of fresh apple juice. *J Pediatr* 1982; 101:963-965.
394. Nathan R. American seeds suspected in Japanese food poisoning epidemic. *Nat Med* 1997; 7: 705-706.
395. Del Rosario BA, Beuchat LR. Survival and growth of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in cantaloupe and watermelon. *J Food Prot* 1995; 58: 105-107.
396. Diaz C, Hotchkiss JH. Comparative growth of *Escherichia coli* O157:H7, spoliage organisms and shelf-life of shredded iceberg lettuce stored under modified atmospheres. *J Sci Food Agric* 1996; 70: 433-438.
397. Abdul-Raouf UM, Beuchat LR, Ammar MS. Survival and growth of *Escherichia coli* O157:H7 on salad vegetables. *Appl Environ Microbiol* 1993; 59: 1999-2006.
398. Beuchat LR. Surface decontamination of fruits and vegetables eaten raw. WHO Publications. Food Safety. Ginebra, 1998. WHO/FSF/FOS/98.2.  
URL: <http://www.who.int/fsf/new.htm>
399. Bartz JA, Showalter RK. Infiltration of tomatoes by bacteria in aqueous suspension. *Phytopathology* 1981; 71:515-518.
400. Zhuang RY, Beuchat LR, Angulo FJ. Fate of *Salmonella montevideo* and in raw tomatoes as affected by temperature and treatment with chlorine. *Appl Environ Microbiol* 1995; 61: 2127-2131.
401. Mazollier J. IVè gamme. Lavage-desinfection des salades. *Infos-Ctifl* 1988; 41: 19.
402. Adams MR, Hartley AD, Cox LJ. Factors affecting the efficiency of washing procedures used in the production of prepared salads. *Food Microbiol* 1989; 6: 69-77.
403. Heuvelink AE, Van der Kar NCAJ, Van der Velden TJAM, Chart H, Monney LAH. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* infection in household member of children with hemolytic-uremic syndrome in the Netherlands. *Pediatr Infect Dis J* 1999; 18: 709-714.
404. American Academy of Pediatrics. *Escherichia coli* Diarrhea. A: Pickering LK, ed. *Red Book: Report of Committe on Infectious Diseases*. 25a ed. Elk Grove Village, IL: American Academy of Pediatrics, 2000; 243-247.
405. PHLS. Communicable Disease Surveillance Centre. Outbreak of VTEC 157 infection at a prison in the Midlands. *Commun Dis Rep Wkly* 1999; 9: 284-285.
406. PHLS. Communicable Disease Suvellance Centre. Outbreaks of *Escherichia coli* O157 infection in two prisons. *Commun Dis Rep Wkly* 2000; 10: 375.



407. Adak GK, Wall PG, Smith HR, Cheasty T, Bolton FJ, Griffin PM, Brune B. PHLS begins a national case control study of *Escherichia coli* O157 infection in England. *Commun Dis Rep Rev* 1996; 6: R144-R146.
408. Michel P, Wilson JB, Wayne Martin S, Clarke RC, McEwen SA, Byles CL, Estimation of the under-reporting rate for the surveillance of *Escherichia coli* O157:H7 cases in Ontario, Canada. *Epidemiol Infect* 2000; 125: 35-45.
409. Adak GK, Taylor CM, Rowe B, Pennington TH, O'Brien S. The United Kingdom Collaborative study of childhood haemolytic uremic syndrome. *SCIEH Wkly Rep* 1997; 97: 13.
410. Ammon A. Surveillance of enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC) infectious and haemolytic uraemic syndrome (HUS) in Europe. *Euro Surveillance* 1997; 2: 91-98.
411. Tauxe RV, Swerdlow DL, Hughes JM. Foodborne Disease. A: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, ed. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 5a edició. Filadèlfia: Churchill Livingstone, 2000: 1150-1164.
412. Hildebrand JM, Maguire HC, Holliman RE, Kangesu E. An outbreak of *Escherichia coli* O157 infection linked to paddling pools. *Commun Dis Rep Rev* 1996; 6: R33-36.

## **ANNEX 1**

### **Les regles d'or de l'Organització Mundial de la Salut per preparar aliments segurs**

## **Les regles d'or de l'Organització Mundial de la Salut per preparar aliments segurs**

### **Escollir aliments processats, per seguretat**

Així com alguns aliments, com ara les fruites i els vegetals, són millors en el seu estat natural, d'altres no són segurs llevat que s'hagin processat. Per exemple, cal comprar sempre llet pasteuritzada en lloc de llet crua. Cal tenir en ment que els aliments processats es van inventar per millorar la seguretat i per allargar-ne la vida útil. Alguns aliments que es mengen crus, com els enciams, s'han de rentar acuradament.

### **Coure els aliments acuradament**

La majoria d'aliments crus, i més notablement l'aviram, les carns, i la llet que no ha estat pasteuritzada, estan contaminats amb patògens causants de malalties. Una cocció acurada eliminarà els patògens, però cal recordar que la temperatura de totes les parts de l'aliment ha d'arribar almenys a 70 °C. Si el pollastre cuit encara està cru al voltant de l'os, s'haurà de posar novament al forn fins que estigui ben cuit. La carn, el peix i el pollastre congelats s'han de descongelar completament abans de cuinar-los.

### **Consumir immediatament els aliments cuinats**

Quan els aliments cuinats es refreden a temperatura ambient, els microbis comencen a proliferar. Com més s'espera, més gran és el risc. Per estar segurs cal menjar els aliments immediatament després que s'han cuinat.

### **Emmagatzemar els aliments cuinats adequadament**

Si es volen preparar els aliments amb anticipació o si se'n volen guardar les restes, s'ha d'assegurar el seu emmagatzematge en calent (a 60 °C o més) o en fred (a un màxim de 10 °C). Aquesta norma és de vital importància si es pretén guardar menjar durant més de quatre o cinc hores. En el cas d'aliments per a infants, és millor que no es guardin. Un error freqüent, responsable d'incomptables casos de toxiinfecció alimentària, és guardar en el frigorífic una quantitat excessiva d'aliments calents. En un frigorífic massa ple, els aliments cuinats no es poden refredar en el seu interior tan ràpidament com caldria. Quan el centre dels aliments continua calent (a més de 10 °C) massa temps, els microorganismes proliferen i assoleixen ràpidament uns nivells susceptibles de causar malaltia.

### **Rescalfar els aliments cuinats correctament**

Aquesta és la millor mesura de protecció contra els microbis que es poden haver desenvolupat durant l'emmagatzematge (un emmagatzematge correcte retarda el creixement microbià però no destrueix els gèrmens). De

nou, un rescalfament correcte implica que totes les parts de l'aliment assoleixin, almenys, una temperatura de 70 °C.

### **Evitar el contacte entre aliments crus i aliments cuinats**

Un aliment ben cuinat es pot contaminar si té un mínim contacte amb aliments crus. Aquesta contaminació encreuada pot ser directa, com quan un pollastre cru entra en contacte amb aliments cuinats. Però també pot ser més subtil. Per exemple, no s'ha de preparar un pollastre cru i utilitzar després la mateixa superfície i el mateix ganivet per tallar l'au cuita. Es podrien reintroduir tots els riscos potencials de creixement microbià i de consegüent malaltia presents abans de la cocció.

### **Rentar-se les mans repetidament**

Cal rentar-se bé les mans abans de començar a preparar aliments i després de qualsevol interrupció, especialment si és per canviar els bolquers a un nen o per anar al lavabo. Després de preparar aliments crus com peix, carn o pollastre, cal tornar-se a rentar abans de començar a manipular altres aliments. En el cas de tenir alguna infecció a les mans, s'han d'embenar o recobrir abans de preparar aliments. Cal recordar també que els animals de companyia (gossos, ocells, tortugues) sovint són portadors d'agents patògens perillosos que poden passar a través de les mans als aliments.

### **Mantenir totes les superfícies de la cuina meticulosament netes**

Com que els aliments es contaminen fàcilment, totes les superfícies utilitzades per a la preparació d'aliments s'han de mantenir totalment netes. Cal pensar que qualsevol deixalla, engruna o taca pot ser un reservori de gèrmens potencial. Els draps que estiguin en contacte amb plats i estris s'han de canviar cada dia i fer-los bullir abans de tornar-los a utilitzar. També cal rentar freqüentment les baietes per rentar el terra.

### **Protegir els aliments contra insectes, rosegadors i altres animals**

Els animals solen transportar microorganismes patògens que poden causar malalties d'origen alimentari. L'emmagatzematge dels aliments en recipients tancats és la millor protecció.

### **Utilitzar aigua potable**

L'aigua potable és tan important per a la preparació dels aliments com per beure. Si hi ha algun dubte sobre el subministrament de l'aigua, cal bullir-la abans d'afegir-la als aliments o de fer glaçons per a les begudes. Cal tenir especial cura amb l'aigua utilitzada per preparar el menjar dels nadons.

## **ANNEX 2**

### **Recomanacions al consumidor**

## Recomanacions al consumidor

### En el moment de la compra:

- Agafar al final de tot els aliments peribles i portar-los directament cap a casa per posar-los a la nevera.
- No comprar aliments que s'hagin d'utilitzar fora de la data de caducitat o de consum preferent.
- Utilitzar bosses isotèrmiques que permetin mantenir les temperatures dels aliments que requereixen fred, principalment els congelats.

### En l'emmagatzematge:

- Refrigerar o congelar immediatament els aliments peribles, els aliments llestos per menjar i les restes de menjar elaborat dins les dues hores després de la seva compra o preparació.
- Mantenir sempre les temperatures del refrigerador entre 4 °C i 7 °C i del congelador a -18 °C.
- Congelar la carn fresca, el pollastre i el peix si no s'han de consumir en pocs dies.
- A la nevera, col·locar la carn fresca, el pollastre i el peix en algun recipient per evitar que els sucs que desprenen contactin amb altres aliments.
- Netejar la brutícia grollera dels vegetals abans de guardar-los a la nevera i evitar que contactin amb altres aliments.
- Retirar els embalatges de cartró dels aliments que en disposin abans d'introduir-los a la nevera.
- A la nevera, mantenir els menjars preparats o els de consum en cru en recipients protegits.

### En la manipulació i la preparació del menjar:

- Rentar-se les mans acuradament i sovint, utilitzant sabó, en particular després d'haver anat al lavabo o després de contactar amb animals domèstics o de granja.
- Rentar-se les mans entre preparacions de diferents aliments.
- Rentar els draps de cuina sovint i amb aigua calenta. Evitar l'ús d'esponges o rentar-les diàriament.
- Utilitzar paper de cuina d'un sol ús, per netejar els sucs despresos per les carns i altres aliments crus.
- Netejar acuradament les superfícies i els estris amb aigua calenta i sabó després de preparar aliments crus i entre preparacions de diferents aliments.

- Netejar les fruites i els vegetals acuradament, particularment si es consumeixen crus.
- Descongelar totalment els aliments en el refrigerador o en el microones i no a temperatura ambient. Marinar els aliments a la nevera.
- Pelar els vegetals i les fruites sempre que sigui possible.
- No col·locar mai un aliment cuinat en un recipient on hi hagi hagut prèviament carn crua, pollastre, ous o productes de la pesca si no s'ha netejat correctament.
- Quan la seguretat de l'aigua de beguda sigui dubtosa, bullir-la o, si no és possible, desinfectar-la amb un agent desinfectant segur. Generalment estan disponibles a les farmàcies.

### **En el moment de servir i consumir:**

- Assegurar que els aliments, particularment els que estiguin fets amb carn picada (com hamburgueses, salsitxes, etc.), estiguin adequadament cuinats (mínim dos minuts a 70 °C) i que encara estiguin calents quan se serveixin.
- No consumir productes de carn picada de color rosa o vermell en el seu interior.
- Cal conèixer que el consum d'aliments elaborats amb carn crua (p. ex: *carpaccio*) comporta un risc sanitari superior perquè l'aliment no ha patit cap tractament tèrmic capaç de destruir els possibles microorganismes presents en la carn.
- Si en un restaurant li han servit una hamburguesa poc cuita, retorni-la perquè la coquin més.
- Evitar el consum de llet crua i els productes elaborats amb llet crua que no hagin patit un procés de maduració superior als 60 dies. Beure només llet pasteuritzada o bullida.
- No consumir aliments cuinats o peribles que hagin estat conservats durant més de dos o tres dies a la nevera i sense rescalfar-los a 70 °C en el centre de la peça.
- No deixar els aliments peribles fora de la nevera durant més de dues hores. Segons la temperatura exterior aquest temps de seguretat s'haurà de reduir a trenta minuts.

## **ANNEX 3**

**Actuacions als escorxadors en l'elaboració de preparats  
de carn i a les indústries càrnies**



## Actuacions als escorxadors en l'elaboració de preparats de carn i a les indústries càrnies

- Als escorxadors s'han de prendre totes les mesures necessàries per evitar que la superfície de la pell dels animals contacti amb la canal i, en particular:
  - No sacrificar animals manifestament bruts: rentar-los abans del sacrifici.
  - En el sagnat dels animals, cal utilitzar un ganivet per a l'obertura de la pell i un altre per tallar els vasos sanguinis.
  - En l'escorxat cal realitzar l'obertura de la pell de dins a fora i netejar i desinfectar escrupolosament el ganivet utilitzat en aquesta tasca.
  - Els manipuladors que toquin la pell dels animals amb les mans han d'evitar tocar la canal sense haver-se rentat i desinfectat.
  - Si, per qualsevol motiu, la pell contacta amb la canal, s'ha de retallar la part de la canal afectada i no realitzar un rentat amb aigua.
- Als escorxadors s'han de prendre totes les mesures necessàries per evitar que el contingut intestinal contami ni la canal i, en concret:
  - Realitzar una lligadura higiènica de l'esòfag i el recte.
  - Evitar el trencament intestinal.
  - Si per qualsevol motiu el contingut intestinal contacta amb la canal, s'ha de retallar la part de la canal afectada i no realitzar un rentat amb aigua.
- Utilitzar estris i superfícies de treball nets i exclusius per a cada tasca i desinfectar-los sovint.
- Refrigerar immediatament les carns després de la inspecció postmortem, abans d'iniciar-se el transport, fins que s'assoleixi una temperatura interna de 10 °C i mantenir la temperatura superficial de les carns sempre per sota dels 10 °C. En aquestes condicions, el temps de durada del transport no ha d'excedir les vuit hores. La legislació vigent obliga a una refrigeració immediata de les canals a 7 °C, llevat que es disposi d'una excepció específica per a aquest requisit.
- Promoure pràctiques higièniques dels manipuladors per evitar contaminacions encreuades:
  - Neteja freqüent de les mans, com a mínim cada vegada que s'inicia el treball després d'alguna aturada, sempre que es vagi al servei i en cas de contacte amb possibles focus de contaminació.
  - Utilització de roba neta i adequada.
- Excloure de les tasques de manipulació d'aliments el personal que presenti diarrees com a mínim fins 48 hores després de la remissió dels símptomes.

## **ANNEX 4**

### **Recomanacions als establiments de restauració col·lectiva**

## Recomanacions als establiments de restauració col·lectiva

- Recomanacions per a la cocció:
  - Realitzar una bona cocció de les peces de carn i els preparats de carn (hamburgueses, salsitxes, etc.). Cal assegurar que s'assoleix una temperatura de com a mínim 68,3 °C durant 15 segons en el centre de la peça, o binomis temps/temperatura d'efecte equivalent, per garantir la destrucció dels bacteris i les toxines.
  - La valoració del color de la carn no és suficient per garantir la temperatura de cocció. La temperatura de cocció s'ha de comprovar mitjançant termòmetres sonda. Es recomana que els productes arribin als 70 °C en el centre de la peça.
  - Netejar i desinfectar els termòmetres després de la seva utilització.
  - Realitzar la cocció dels aliments quan aquests estiguin totalment descongelats.
  - Evitar temperatures de cocció molt elevades en forn o fregidora, que podrien formar crostes als aliments que no permetrien la penetració de l'escalfor al centre de la peça.
  - Programar el temps de cocció en funció del volum de l'aliment, de les seves característiques intrínseques (contingut en greix, pH, humitat, etc.) i de qualsevol altre factor que pugui fer variar l'efectivitat del procés.
  - Prestar especial atenció als tractaments tèrmics superficials com els escaldats i les planxes.
  - Quan s'hagi de rescalfar un menjar preparat, assegurar una temperatura mínima de 70 °C al centre de la peça.
- Evitar els plats a base d'aliments d'origen animal crus o amb tractament tèrmic insuficient com *carpaccio*, *steak tartar*, etc.
- Pràctiques higièniques dels manipuladors per evitar contaminacions encruades:
  - Utilització d'estrís nets i exclusius per a cada tasca.
  - Exclusió de les tasques de manipulació d'aliments del personal que presenti diarrea com a mínim fins 48 hores després de la remissió dels símptomes.
  - Neteja freqüent de les mans, com a mínim cada vegada que s'inicia el treball després d'alguna aturada, sempre que es vagi al lavabo i en cas de contacte amb possibles focus de contaminació. Per optimitzar-ne l'eficàcia és recomanable fer un doble rentat. En el primer rentat s'ha d'utilitzar un raspall d'ungles incidint especialment en la pun-

ta dels dits i les ungles, per tal d'arrossegar al màxim la brutícia, amb sabó i aigua calenta. A continuació es fa un segon rentat sense raspall, amb sabó i aigua calenta, de les mans i part exposada dels braços. Finalment, s'han d'eixugar completament, amb paper.

- Evitar que en les superfícies de treball es produeixi el contacte de productes crus destinats a ser cuinats amb productes cuits o crus llestos per al consum.
- Emmagatzemar els productes correctament, de manera que s'evitin les contaminacions encreuades entre productes crus i productes llestos per al consum o entre les instal·lacions d'emmagatzematge i els aliments.
- Evitar el consum de llet crua si no s'ha bullit prèviament. Es recomana utilitzar productes pasteuritzats o esterilitzats.
- Recomanacions per a la neteja i desinfecció de fruites i verdures:
  - Realitzar un tractament doble de verdures i fruites de consum en cru consistent en un primer rentat amb aigua potable corrent, per tal d'eliminar al màxim la matèria orgànica (terra, brutícia), i posteriorment, immersió del producte amb aigua amb clor (50-200 ppm).
  - La temperatura de l'aigua utilitzada en el rentat i tractament de verdures i fruites ha de ser superior a la del producte.
  - No tallar els vegetals abans de realitzar el tractament de rentat i desinfecció.
  - No deixar els vegetals ni fruites més temps del necessari (5-10 minuts) en immersió.
  - Mantenir els vegetals i les fruites tractades secs i protegits de recontaminació.
  - Netejar meticulosament (si cal, raspallar la superfície) i desinfectar les fruites senceres quan s'hagin d'utilitzar les closques (per exemple de pinya o meló) com a contenidors de amanides preparades o la polpa com a ingredient en amanides.
  - Rentar meticulosament i desinfectar amb aigua i clor el julivert o altres herbes fresques addicionades a preparats carnis, formatges, productes de la pesca o menjars preparats.
  - Sempre que sigui possible, es recomana rentar i consumir les fruites pelades, amb la mínima antelació al seu consum.
- Realitzar el transport dels menjars preparats a la temperatura adequada: temperatura de refrigeració (4 °C - 8 °C) per al transport en fred i temperatura mínima de 65 °C per al transport en calent.

## **ANNEX 5**

### **Unitats territorials de vigilància epidemiològica**

## Unitats territorials de vigilància epidemiològica

### Institut Municipal de Salut Pública

#### *Servei d'Epidemiologia*

Plaça Lesseps, 1  
08023 Barcelona  
Telèfon: 93 238 45 45  
Fax: 93 17 31 97

### Delegació Territorial de Sanitat

#### *Secció d'Epidemiologia*

Pg. de Lluís Companys, 7  
08003 Barcelona  
Telèfon: 93 567 11 60  
Fax: 93 567 11 74

### Delegació Territorial de Sanitat

#### *Secció d'Epidemiologia*

Carrer del Sol, 15  
7004 Girona  
Telèfon: 972 20 00 54  
Fax: 972 21 99 07

### Delegació Territorial de Sanitat

#### *Secció d'Epidemiologia*

Av. de l'alcalde Rovira Roure, 2  
25006 Lleida  
Telèfon: 973 70 16 00  
Fax: 973 24 91 40

### Delegació Territorial de Sanitat

#### *Secció d'Epidemiologia*

Av. Maria Cristina, 54  
43002 Tarragona  
Telèfon: 977 22 41 51  
Fax: 977 21 89 54

## **ANNEX 6**

### **Notificació individualitzada de malalties de declaració obligatòria**



Codi (reservat a la regió sanitària)

M A R Núm.

M. Malaltia A. Any R. Regió Núm. de fitxa

### Notificació individualitzada de malalties de declaració obligatòria

#### Dades del pacient

Nom \_\_\_\_\_ Cognoms \_\_\_\_\_

Data de naixement \_\_\_\_\_ Sexe \_\_\_\_\_  
 Home  Dona

Adreça: \_\_\_\_\_ Núm. \_\_\_\_\_ Telèfon \_\_\_\_\_  
 Carrer \_\_\_\_\_

Municipi \_\_\_\_\_ Província \_\_\_\_\_ Districte mpal. \_\_\_\_\_ Codi \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

Pais d'origen \_\_\_\_\_ Si resideix a l'estranger, especifiqueu-ne el país Codi \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

#### Dades relatives a la malaltia

Declaració del cas \_\_\_\_\_ Data d'inici dels símptomes \_\_\_\_\_  
 setmana núm. \_\_\_\_ de 20\_\_\_\_

Nom de la malaltia \_\_\_\_\_

<input type="checkbox"/> 47 Amebiasi	<input type="checkbox"/> 14 Altres hepatitis víriques (menys A i B)	<input type="checkbox"/> 24 Ràbia
<input type="checkbox"/> 53 Botulisme	<input type="checkbox"/> 41 Hidatidiosi	<input type="checkbox"/> 25 Rubèola
<input type="checkbox"/> 01 Brucel·losi	<input type="checkbox"/> 46 Legionel·losi	<input type="checkbox"/> 51 Rubèola congènita
<input type="checkbox"/> 02 Carboncle	<input type="checkbox"/> 15 Leishmaniosi	<input type="checkbox"/> 06 Shigel·losi
<input type="checkbox"/> 04 Còlera	<input type="checkbox"/> 16 Lepra	<input type="checkbox"/> 52 Sífilis congènita
<input type="checkbox"/> 05 Difteria	<input type="checkbox"/> 54 Malaltia invasiva per <i>Haemophilus influenzae</i> b	<input type="checkbox"/> 57 Síndrome hemolítica urèmica
<input type="checkbox"/> 28 Febre botonosa	<input type="checkbox"/> 18 Malaltia meningocòccica	<input type="checkbox"/> 40 Tètanus
<input type="checkbox"/> 09 Febre groga	<input type="checkbox"/> 50 Meningitis tuberculosa	<input type="checkbox"/> 55 Tètanus neonatal
<input type="checkbox"/> 12 Febre tifòide i paratífòide	<input type="checkbox"/> 20 Paludisme	<input type="checkbox"/> 27 Tífus exantemàtic
<input type="checkbox"/> 56 Gastroenteritis per <i>Escherichia coli</i> O157:H7	<input type="checkbox"/> 21 Parotiditis	<input type="checkbox"/> 03 Tos ferina
<input type="checkbox"/> 48 Hepatitis A	<input type="checkbox"/> 22 Pesta	<input type="checkbox"/> 30 Triquinosis
<input type="checkbox"/> 49 Hepatitis B	<input type="checkbox"/> 23 Poliomielitis	<input type="checkbox"/> 31 Tuberculosi pulmonar
		<input type="checkbox"/> 32 Altres tuberculosi (menys tuberculosi pulmonar i meningitis tuberculosa)
		<input type="checkbox"/> 35 Xarampió

La declaració es realitza a partir de \_\_\_\_\_  
 sospita clínica  confirmació analítica

#### Dades del metge declarant

Nom \_\_\_\_\_ Cognoms \_\_\_\_\_

Núm. de col·legiat \_\_\_\_\_ Província de col·legiació \_\_\_\_\_ Telèfon \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

Si declara el cap local de Sanitat, esmenteu-hi el municipi \_\_\_\_\_

Si es declara des d'un centre sanitari, nom del centre \_\_\_\_\_ Codi \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

Municipi \_\_\_\_\_ Telèfon \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

Data de la declaració \_\_\_\_\_ Signatura \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

Informació d'ús estrictament confidencial



## **ANNEX 7**

**Fitxa epidemiològica. Cas de colitis hemorràgica  
per *E. coli* verotoxígena**



Codi (reservat a la regió sanitària)

M A R Núm.  
 M. Malaltia A. Any R. Regió Núm. de fitxa

### Fitxa epidemiològica. Cas de colitis hemorràgica per *E. coli* verotoxigena

#### Dades del pacient

Nom \_\_\_\_\_ Cognoms \_\_\_\_\_

Data de naixement \_\_\_\_\_ Sexe \_\_\_\_\_  
 Home  Dona

Adreça: \_\_\_\_\_ Núm. \_\_\_\_\_ Telèfon \_\_\_\_\_

Carrer o plaça \_\_\_\_\_

Municipi \_\_\_\_\_ Província \_\_\_\_\_ Districte mpal. \_\_\_\_\_ Codi \_\_\_\_\_

País d'origen \_\_\_\_\_ Si resideix a l'estranger, especifiqueu-ne el país \_\_\_\_\_ Codi \_\_\_\_\_

Data d'inici dels símptomes \_\_\_\_\_ Hora \_\_\_\_\_

#### Dades clíniques

Febre  1. Sí  2. No  9. Nc Anèmia hemolítica  1. Sí  2. No  9. Nc

Vòmits  1. Sí  2. No  9. Nc Trombocitopènia  1. Sí  2. No  9. Nc

Diarrea sanguinolenta  1. Sí  2. No  9. Nc Fallida renal aguda  1. Sí  2. No  9. Nc

Altres  1. Sí  2. No  9. Nc Especifiqueu-ho .....

Hospitalització \_\_\_\_\_ Data d'ingrés \_\_\_\_\_ Centre hospitalari \_\_\_\_\_ Data d'alta hospitalària \_\_\_\_\_  
 Sí  No  \_\_\_\_\_

#### Dades microbiològiques

Aïllament  1. Sí  2. No  9. Nc Detecció de verotoxina a la femta  1. Sí  2. No  9. Nc

Mètode de detecció de verotoxina \_\_\_\_\_ Altres proves (especifiqueu-les) \_\_\_\_\_

#### Dades epidemiològiques

Pertany a algun dels següents grups de risc de transmetre la infecció?

1. Manipulador d'aliments  4. Nen que assisteix a guarderia / centre preescolar

2. Treballador d'un establiment sanitari  5. Nen o adult que es troba en institucions tancades

3. Treballador de guarderia / centre preescolar

Si alguna de les anteriors és afirmativa, especifiqueu el nom, l'adreça i el telèfon del centre \_\_\_\_\_

Ha fet viatges a l'estranger 15 dies abans de l'inici dels símptomes?  1. Sí  2. No  9. Nc

Lloc \_\_\_\_\_ País \_\_\_\_\_ Dates \_\_\_\_\_

Lloc \_\_\_\_\_ País \_\_\_\_\_ Dates \_\_\_\_\_

Ha tingut contacte amb animals durant els 15 dies abans de l'inici dels símptomes?  1. Sí  2. No  9. Nc

En cas afirmatiu, especifiqueu el lloc del contacte, l'adreça i el telèfon \_\_\_\_\_

El cas forma part d'un brot epidèmic?  1. Sí  2. No  9. Nc

En cas afirmatiu, especifiqueu-ho \_\_\_\_\_

Hi ha hagut contacte amb malalt o portador durant la quinzena abans de l'inici de la simptomatologia?  1. Sí  2. No  9. Nc

Nom i cognoms \_\_\_\_\_

Nom i cognoms \_\_\_\_\_

Nom i cognoms \_\_\_\_\_

**Consum d'aliments sospitosos** (durant la quinzena anterior a l'inici dels símptomes)

Carn de vedella o bou  1. Sí  2. No  9. Nc  ben cuita  poc cuita  crua

Lloc de consum

Domicili. Nom i adreça de l'establiment on va ésser adquirida Data d'adquisició

..... |\_|\_|\_|\_|

Restaurant. Nom i adreça Data de consum

..... |\_|\_|\_|\_|

Llet  1. Sí  2. No  9. Nc  crua  pasteuritzada

Lloc de consum

Domicili. Nom i adreça de l'establiment on va ésser adquirida Data d'adquisició

..... |\_|\_|\_|\_|

Restaurant. Nom i adreça Data de consum

..... |\_|\_|\_|\_|

Altres aliments sospitosos (vegetals crus...)  1. Sí  2. No  9. Nc. En cas afirmatiu especifiqueu-los

Lloc de consum

Domicili. Nom i adreça de l'establiment on varen ésser adquirits Data d'adquisició

..... |\_|\_|\_|\_|

Restaurant. Nom i adreça Data de consum

..... |\_|\_|\_|\_|

Tipus d'aigua consumida durant la quinzena abans de l'inici dels símptomes?

1. Xarxa pública. Especifiqueu-ho .....

2. Pou. Especifiqueu-ho .....

3. Font. Especifiqueu-ho .....

4. Altres. Especifiqueu-ho .....

Posteriorment a l'aparició d'aquest cas, s'han presentat altres casos de malaltia entre:

Amics  1. Sí  2. No Familiars  1. Sí  2. No Companys de classe / treball?  1. Sí  2. No

En cas afirmatiu: Nom i cognoms .....

Nom i cognoms .....

Nom i cognoms .....

**Mesures adoptades**

Comunicació a Higiene Alimentària  1. Sí  2. No Data |\_|\_|\_|\_|

Comunicació a Veterinària  1. Sí  2. No Data |\_|\_|\_|\_|

**Control i evolució**

Curació  1. Sí  2. No  9. Ns/Nc

Comprovació de curació microbiològica  1. Sí  2. No  9. Ns/Nc

Resultat del 1r. coprocultiu  1. +  2. - Data |\_|\_|\_|\_|

Resultat del 2n. coprocultiu  1. +  2. - Data |\_|\_|\_|\_|

Defunció  1. Sí  2. No  9. Ns/Nc Data de defunció |\_|\_|\_|\_|

**Observacions**

**Dades de l'enquestador**

Nom de l'enquestador Telèfon Data de tancament de la fitxa

|\_|\_|\_|\_| |\_|\_|\_|\_|





[www.gencat.es/sanitat](http://www.gencat.es/sanitat)

ISBN 84-393-5343-X



9 788439 353430