

# Asociación del síndrome urémico hemolítico con la infección por *Escherichia coli* productor de toxina Shiga

## *Association between uremic hemolytic syndrome and infection by Shiga toxin-producing Escherichia coli*

► Silvana Mónica Giugno<sup>1</sup>, Norma Bibiloni<sup>2</sup>, Ricardo Rahman<sup>3</sup>, Elizabeth Miliwebsky<sup>4</sup>, Isabel Chinen<sup>4</sup> y Marta Rivas<sup>4</sup>

1. Licenciada en Bioquímica, Laboratorio Central. Hospital I.A.E.P. "Superiora Sor María Ludovica".
2. Médica, Servicio de Nefrología. Hospital I.A.E.P. "Superiora Sor María Ludovica".
3. Médico, Jefe del Servicio de Nefrología. Hospital I.A.E.P. "Superiora Sor María Ludovica".
4. Bioquímica, Servicio Fisiopatología, INEL-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán".

Hospital Interzonal de Agudos Especializado en Pediatría "Superiora Sor María Ludovica". Calle 14 N° 1631, 1900 La Plata, Argentina.

Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud "Dr. Carlos G. Malbrán". Av. Vélez Sarsfield 563, 1281 Buenos Aires, Argentina.

### Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957

## Resumen

Entre enero de 1997 y diciembre de 2002 se estudiaron 208 pacientes pediátricos con síndrome urémico hemolítico (SUH) para establecer su asociación con la infección por *Escherichia coli* productor de toxina Shiga (STEC). La edad promedio de los pacientes fue  $22 \pm 19$  meses. El 53,8% fue de sexo femenino. Los casos se presentaron principalmente en niños eutróficos (85,1%), de condición socioeconómica media (52%), durante el verano y principio del otoño (87%). El 95,5% de los niños presentó diarrea, que en el 74,2% de los casos fue sanguinolenta. El 44% de los pacientes recibió antibioticoterapia durante el período prodrómico. Se aisló STEC en 9,8% de los casos. El serotipo aislado con mayor frecuencia fue *Escherichia coli* O157:H7 (83,3%) y se detectó la toxina Shiga libre en materia fecal (StxMF) en el 21% de las muestras estudiadas. Se encontraron evidencias acumulativas de infección por STEC en 59,1% de los pacientes.

**Palabras clave:** síndrome urémico hemolítico \* *Escherichia coli* productor de toxina Shiga \* niños

## Summary

Between January 1997 and December 2002, a total of 208 pediatric patients with hemolytic uremic syndrome (HUS) were studied to establish its association with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) infection. The median age was  $22 \pm 19$  months, and 53.8% were female patients. Cases were mainly well nourished children (85.1%) from a middle class condition (52%); 95.5% had diarrhea, (bloody diarrhea in 74.2%), during the summer and at the beginning of autumn (75%).

Forty-four per cent received antibiotic therapy during the prodromic period. STEC was isolated in 9.8% of the cases, being *Escherichia coli* O157:H7 the most frequent serotype isolated (83.3%). Shiga free toxin was detected in stools (StxMF) in 21% of the samples studied. Cumulative evidences of infection by STEC were found in 59.1% of the patients.

**Keywords:** hemolytic uremic syndrome \* Shiga toxin-producing *Escherichia coli* \* children

## Introducción

El síndrome urémico hemolítico (SUH) epidémico, posentérico o forma clásica, se caracteriza por falla renal aguda, anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia y compromiso del sistema nervioso central de grado variable (1).

El SUH, con o sin colitis hemorrágica, es predominantemente una enfermedad que requiere hospitalización. Ocurre en niños, especialmente lactantes, con una media de edad de 17,3 meses. La mortalidad en centros especializados es menor al 4% (2). Es la causa más frecuente de insuficiencia renal aguda en edad pediátrica y constituye una importante causa de insuficiencia renal crónica en la adolescencia y juventud, que puede determinar el ingreso a programas de diálisis y trasplante renal (3). Por tratarse de una enfermedad sistémica, puede afectarse cualquier órgano: páncreas, hígado, miocardio, músculo u otros (4).

Durante las pasadas dos décadas *Escherichia coli* productor de toxina Shiga (STEC) ha sido asociado con el SUH, como así también con casos de diarrea sin complicaciones y portación en individuos sanos (5). En algunos pacientes la afección digestiva es la dominante, especialmente en el nivel del colon y se puede confundir con otras patologías como apendicitis, colitis isquémica ulcerativa u otros procesos infecciosos producidos por *Shigella* spp, *Campylobacter* spp, etc. (6).

STEC se ha asociado con enfermedad entérica en el año 1983, cuando Riley *et al.* comunicaron el aislamiento de *Escherichia coli* O157:H7 de pacientes con colitis hemorrágica, asociada con la ingestión de hamburguesas mal cocidas (7). En el mismo año Karmali, *et al.* (8) informaron la asociación entre la infección por STEC y el SUH.

El origen alimentario de la infección ha quedado demostrado en varios estudios posteriores, siendo las heces bovinas el origen más común de la contaminación. La dosis infectante es muy pequeña, del orden de 10<sup>2</sup> UFC (9)(10). La transmisión se produce por alimentos y aguas contaminadas con heces bovinas y de persona a persona.

*Escherichia coli* O157:H7 es el prototipo de más de 150 serotipos de *Escherichia coli* (O26:H11, O103:H2, O111:NM, O113:H21, O145:NM, entre otros) que

comparten el mismo potencial patogénico, pero solamente algunos están relacionados con enfermedades severas en humanos. Los serotipos relacionados con enfermedades severas pertenecen a la categoría de *Escherichia coli* enterohemorrágico (EHEC) (11).

Los estudios realizados en modelos animales e *in vitro* describen distintos mecanismos de virulencia, pero el más importante sigue siendo la producción de una potente citotoxina, codificada por un bacteriófago, llamada toxina Shiga (Stx). Las cepas de origen humano pueden producir Stx1, Stx2 y variantes, solas o combinadas (Stx1/Stx2, Stx1/Stx2v o Stx2/Stx2v).

Stx1 es idéntica a la toxina Shiga de *Shigella dysenteriae* 1 en la secuencia de aminoácidos y no puede distinguirse de ésta por serología, mientras que existe un 58% de homología entre Stx1 y Stx2 (12). Poseen un plásmido de 60 MDa (po157), implicado en la expresión de una fimbria de adherencia (fimbria EHEC) y una toxina RTX llamada enterohemolisina de EHEC (EHEC-Hly), la cual se asocia con enfermedad severa en el hombre (13). Se ha sugerido que una proteasa codificada por el mismo plásmido (EspP) actuaría como factor de virulencia adicional.

Al igual que *E. coli* enteropatógeno, posee un gen cromosomal llamado *eae* que codifica una proteína llamada intimina, responsable de la unión íntima de la bacteria al enterocito y la desorganización de las microvellosidades, con producción de la lesión A/E (del inglés *attachment and effacement*). Las cepas que portan el gen de la intimina y son productoras de Stx2 están asociadas a enfermedades severas en el hombre (14).

El objetivo del presente trabajo fue caracterizar los casos de SUH de niños internados en la Sala de Nefrología de este Hospital y establecer su asociación con la infección por STEC.

## Materiales y Métodos

### POBLACIÓN

Entre el 1 de enero de 1997 y el 12 de diciembre de 2002 se estudiaron 208 pacientes con diagnóstico clínico de SUH, internados en el Servicio de Nefrología del hospital. Los pacientes con SUH fueron definidos

como niños previamente sanos, que presentaron anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia e insuficiencia renal aguda.

#### RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS

Se tomó muestra de materia fecal en el momento de la internación para la detección de patógenos reconocidos: *E. coli* (STEC y *E. coli* O157:H7), *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Campylobacter* sp., *Yersinia* sp., *Aeromonas* sp. y detección de Stx libre en materia fecal (StxMF). Se obtuvieron dos muestras de suero: una al ingreso del paciente y otra, cuando fue posible, 20 días después.

#### CRITERIOS DIAGNÓSTICOS

Para el aislamiento y caracterización de STEC, se seleccionaron 6 a 10 colonias fermentadoras de lactosa del cultivo primario en agar EMB, identificadas como *E. coli* para la detección de STEC no-O157 y 6 a 10 colonias no fermentadoras de sorbitol a partir del agar MacConkey Sorbitol para la detección de *E. coli* O157.

El diagnóstico y la caracterización genotípica de los factores de virulencia de STEC se realizaron en el Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas - ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán" mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los oligonucleótidos o *primers* específicos que amplifican los fragmentos de los genes de las toxinas Shiga 1 y 2 (Stx1, Stx2) (15), de la enterohemolisina EHEC-*hly* (13) y el factor *eae* (16).

Los aislamientos se cultivaron en agar tripticasa de soja y posteriormente en caldo Penassay (Antibiotic Medium n° 3, Difco Laboratories, Detroit, Estados Unidos), incubándose a 37 °C durante 18 h. Los sobrenadantes bacterianos y extractos celulares periplásmicos, obtenidos por tratamiento con sulfato de polimixina B según Karmali, *et al.* (17), fueron ensayados para la detección de la citotoxicidad específica en células Vero, utilizando los anticuerpos monoclonales Stx1 (Mab 13C4) y Stx2 (Mab BC5BB12) (cedidos gentilmente por la Dra. Strockbine, Center for Infectious Disease, Atlanta GA, Estados Unidos) como ya fue descripto (8).

El fenotipo enterohemolítico de las cepas fue determinado utilizando placas de agar triptosa base sangre, suplementado con CaCl<sub>2</sub> y sangre desfibrinada de oveja, lavada con *buffer* fosfato salino (PBS 0,01 M; pH 7,2). La hemólisis debida a EHEC-Hly se detectó después de 18 h de incubación a 37 °C, según Beutin, *et al.* (18).

La serotipificación de las cepas de *E. coli* se realizó con antisueros específicos O y H por técnicas de aglutinación en lámina y tubo, respectivamente, según Ørskov, *et al.* (19), mientras que la biotipificación se hizo según Krishnan, *et al.* (20).

La genotipificación de Stx2 y sus variantes se realizó por el análisis del polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) del producto de amplificación obtenido por PCR de una región de la subunidad B de la toxina según lo descrito por Tyler, *et al.* (21).

La subtipificación de los aislamientos de STEC O157:H7 se cumplimentó con la aplicación de las técnicas de fagotipificación y macrorrestricción con la enzima *Xba*I y separación de los fragmentos por electroforesis de campos pulsados (PFGE- del inglés *pulsed-field gel electrophoresis*).

Los fagotipos (PT) se establecieron mediante la técnica descrita originalmente por Ahmed, *et al.* (22) y luego modificada por Khakhria, *et al.* (23). Los fagos utilizados para tipificar *E. coli* O157:H7 fueron cedidos gentilmente por R. Ahmed (Laboratory Centre for Disease Control, Winnipeg, Manitoba, Canadá).

La técnica de *Xba*I-PFGE se realizó según el protocolo estandarizado por los Centers for Disease Control and Prevention (CDC, Atlanta, GA, Estados Unidos), con algunas modificaciones (24).

Para la detección de toxina libre en materia fecal (StxMF), se mezclaron vigorosamente un volumen de materia fecal con 3 de PBS y se centrifugaron. El sobrenadante libre de bacterias fue ensayado para la detección de la citotoxicidad específica en células Vero, utilizando anticuerpos monoclonales (8).

La detección de anticuerpos neutralizantes a-Stx se realizó en células Vero, empleando 4 DC50 de toxinas de cepas de referencia 981 (Stx1) y 1271 (Stx2). La seroconversión fue definida como el aumento del título de anticuerpos a-Stx 4 entre la muestra 1 y la 2 (8).

## Resultados

En el período comprendido entre enero de 1997 y diciembre de 2002 se internaron en el Servicio de Nefrología del Hospital 231 pacientes con diagnóstico de SUH. En el laboratorio se recibieron muestras de 208 pacientes (90%).

El SUH se presentó en 177 niños eutróficos (85,1%), 7 distróficos (3,4%) y 24 (11,5%) sin este dato. Con respecto a la condición socioeconómica, fueron de clase media 108 pacientes (52%) y baja 71 (34,1%); en 29 (13,9%) no se obtuvo este dato. La edad promedio fue de 22±19 meses. Con relación a la edad, 155 casos (74,5%) tenían entre 6 y 24 meses; la mayor frecuencia se presentó en el grupo de 12 a 24 meses con 96 casos (46%) (Fig. 1). El 53,8% correspondió al sexo femenino. La distribución estacional en la presentación de la enfermedad fue de 188 casos (90,4%) en los meses cálidos y 20 en invierno (9,6%).

Antes de desarrollar SUH, 170 de 178 pacientes (95,5%) tuvieron diarrea; en 132 (74,2%) fue muco-

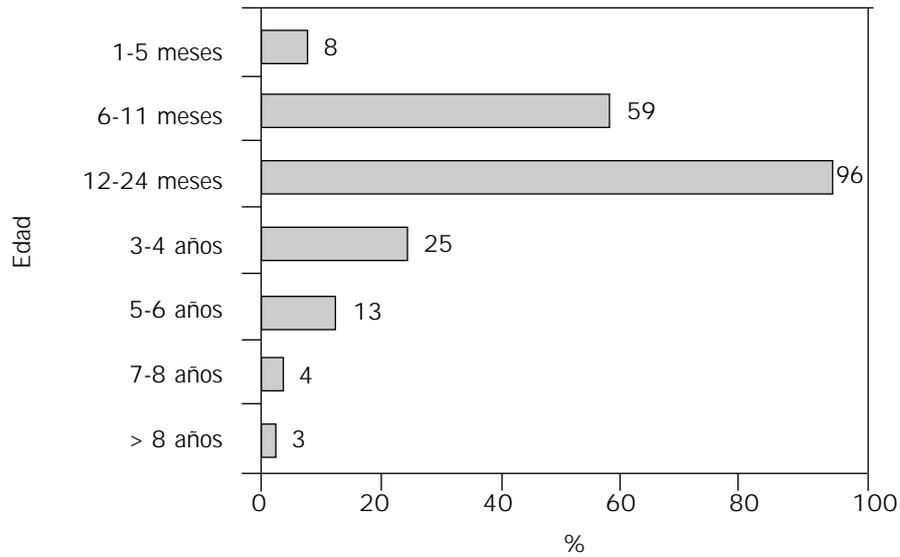


Figura 1. Distribución por grupo etario, período 1997-2002 (n=208).

sanguinolenta. Las muestras de materia fecal se obtuvieron con un promedio de 7,5 días entre la iniciación de los síntomas de diarrea y la instauración del SUH.

Como se observa en la Tabla I, el tratamiento antibiótico previo varía de 51,8% en 1999 a 15,9% en 2001, con un total de 44% para los 6 años de estudio. En 12 de 122 casos de SUH (9,8%) se aisló STEC. De éstos, 10 (83,3%) correspondieron al serotipo O157:H7 (*stx2+stx2vh-a/eae/EHEC-hlyA*), biotipo C (dulcitol+/L-ramnosa+). Los otros serotipos fueron O91:H21 (*stx2/EHEC-hlyA*) y O178:H19 (*stx1/stx2/EHEC-hlyA*). Con respecto a la producción de toxina y actividad hemolítica se presentó en el 100% de los casos. Entre las 10 cepas de STEC O157 se identificaron PT (3 cepas), PT 2 (2 cepas), PT 4 (3 cepas) y PT 49 (2 cepas). Tres cepas presentaron patrones de lisis no descriptos hasta el momento. Por *Xba*I-PFGE las cepas O157 resultaron

ser genéticamente diferentes con un porcentaje de similitud mayor al 80%. La toxina Shiga se detectó en muestras de 34 (22,1%) de 154 pacientes, de los cuales 33 (21,4%) correspondieron a Stx2. El mayor porcentaje fue el de 1999 con 29,2%. Se detectaron anticuerpos a-Stx en 103 de 179 pacientes (57,5%), con un valor de 92,6% en 1999.

Se encontró evidencia de infección por STEC en casos de SUH, determinada por uno o más criterios diagnósticos, en 110 de 208 pacientes (52,9 %) (Tabla II).

## Discusión

Se pudo demostrar la asociación entre SUH y STEC en 52,9% de los 208 casos en los que se hicieron los estudios correspondientes en el laboratorio.

Tabla I. Evidencias de infección por STEC en casos de SUH, 1997- 2002 (n=208).

Año	Días*	STEC		STMF		a-Stx		Antibiótico-terapia**	
		Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
1997	7,7	1/22	4,5	2/28	7,1	10/31	32,2	16/32	50
1998	6,8	3/25	12,0	2/29	6,9	26/31	83,9	13/29	44,8
1999	7,4	3/27	11,1	8/24	29,2	25/27	92,6	14/27	51,8
2000	7,2	0/13	0	2/17	11,8	14/19	73,7	10/22	45,4
2001	8,0	2/13	15,4	7/23	30,4	16/26	61,5	3/19	15,8
2002	7,4	4/22	18,2	11/33	33,3	12/45	26,7	18/39	46,1
	7,5	12/122	10,0	34/154	22,1	103/179	57,5	74/168	44,0

\* Días entre iniciación de síntomas y toma de muestra  
 \*\* Antibióticoterapia anterior al desarrollo de síndrome urémico hemolítico  
 a-Stx: Anticuerpo antitoxina Shiga  
 STEC: *Escherichia coli* productora de toxina Shiga.  
 STMF: Toxina libre en materia fecal.

Tabla II. Evidencia acumulativa por STEC en casos de SUH, 1997-2000 (n=208).

Criterio diagnóstico	Número de casos
STEC	1
STEC + STMF + a-Stx	8
STMF + a-Stx	20
STMF	6
STEC + a-Stx	3
a-Stx	72
Total	110 (52,9%)
a-Stx: Anticuerpo antitoxina Shiga STEC: <i>Escherichia coli</i> productora de toxina Shiga STMF: Toxina libre en materia fecal SUH: síndrome urémico hemolítico	

El mayor número de niños fue de clase social media y eutrófico, coincidiendo con lo publicado por Gianantonio, *et al.* (1).

El alto número de niños con un pródromo de diarrea, fundamentalmente mucosanguinolenta (74,2%), y una distribución estacional con tendencia a aumentar en los meses cálidos, es similar a lo publicado en otros países (25). La enfermedad afectó en igual forma a varones y niñas, y la mayor frecuencia se presentó en menores de 24 meses (26).

Se pudo aislar STEC en el 10% de los pacientes estudiados. La escasa recuperación del patógeno se debe al alto número de niños con tratamiento antibiótico previo (44%) y al tiempo transcurrido entre la toma de la muestra para realizar el coprocultivo y la iniciación de la diarrea.

El serotipo aislado con más frecuencia fue *E. coli* O157:H7 productor de Stx2. Esto es similar a lo que ocurre en Estados Unidos y Canadá, tanto en SUH como en la colitis hemorrágicas (11) (20) (27). Este perfil también coincide con lo detectado en otras zonas de Argentina donde Stx2 es prevalente (28), pero difiere de lo observado en Chile (29), donde en un estudio de caso control se detectaron STEC serogrupos O26, O111 y O157 en el 30% de los pacientes con SUH, principalmente Stx1 o Stx1/Stx2.

Todos los aislamientos de STEC fueron cepas hemolíticas, hecho que coincide con lo descrito por Beutin, *et al.* (18). En el presente estudio también se aislaron cepas enterohemolíticas O91:H21 productora de Stx2 y O178:H19 productora de Stx1/Stx2, pero negativas para el factor de enteroadherencia *eae*. Evidentemente estas cepas deben tener otros mecanismos de unión al epitelio intestinal, distintos de intimina codificada en el gen cromosómico *eae* (30) (31).

La diferencia observada entre los patrones de *Xba*I-PFGE y los fagotipos detectados confirma la diversidad existente entre las cepas de STEC O157 estudiadas. En diferentes partes del mundo se han notificado

brotos debidos a este microorganismo, asociados a casos de diarrea con o sin sangre y a casos más severos de SUH (32). Sin embargo en Argentina, a pesar de su alta tasa de incidencia, no se han detectado brotes debidos a este patógeno.

Con respecto a la detección de StxMF (22%) y anticuerpos a-Stx (57,5%), éstos son inferiores a los hallados por Novillo, *et al.* (33), quienes detectaron StxMF en 15 de 49 pacientes con SUH (31%) y anticuerpos en 11 de 18 (61%).

En este trabajo, el uso de técnicas de serología para la detección de anticuerpos anti-Stx, así como la técnica de detección de toxina libre en materia fecal, aumentaron la sensibilidad en el diagnóstico de la infección por EHEC.

Se considera que el aislamiento del microorganismo implicado es el criterio de diagnóstico definitivo. Sin embargo, la detección de StxMF y anticuerpos anti-Stx son otros criterios que lo confirmarían.

La incidencia de SUH puede disminuir con la información para la población respecto al consumo de alimentos bien cocidos y lácteos pasteurizados. En Argentina, Pérez, *et al.* (34), en un trabajo de caso control, demostraron que los niños expuestos al consumo de leche no pasteurizada padecían SUH más frecuentemente.

Las normas de higiene personales, que explican los brotes en instituciones cerradas y en el hogar (35) (36), hacen muy importante que el área de Salud Pública esté orientada a la prevención.

#### CORRESPONDENCIA

DRA. SILVANA MÓNICA GIUGNO  
 Calle 29 n.º 127 e/34-35.  
 1900 LA PLATA.  
 Provincia de Buenos Aires, Argentina  
 Tel.: 0221 4796675  
 E-mail: silvinagiugno@ciudad.com.ar

## Referencias bibliográficas

1. Gianantonio C, Vitacco M, Mendilaharsu F, Ruty A, Mendilaharsu J. The hemolytic-uremic syndrome. *J Pediatr* 1964; 64: 478-91.
2. Sociedad Argentina de Pediatría. Comité de Nefrología. Incidencia del síndrome urémico hemolítico (SUH) en la República Argentina. *Arch Argent Pediatr* 1997; 93: 409-11.
3. Repetto HA. Haemolytic-uraemic syndrome—the experience in Argentina. *Nephrol Dial Transplant* 1999; 14 (3): 548-50.
4. Siegler RL. The hemolytic uremic syndrome. *Pediatr Clin North Am* 1995; 42 (6): 1505-29.
5. Orr P, Lorenz B, Brown R, Kielly R, Tan B, Holton D, *et al.* An outbreak of diarrhea due to verotoxin-producing *Escherichia coli* in the Canadian Northwest Territories. *Scand J Infect Dis* 1994; 26 (6): 675-84.
6. Rivas M, Miliwebsky E, Balbi L, Garcia B, Leardini N, Tous M, *et al.* Intestinal bleeding and occlusion associated with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O127:H21. *Medicina (B Aires)* 2000; 60 (2): 249-52.
7. 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 (3): 512-20.
8. Karmali MA, Petric M, Lim C, Fleming PC, Arbus GS, Lior H. The association between idiopathic hemolytic uremic syndrome and infection by verotoxin-producing *Escherichia coli*. *J Infect Dis* 1985; 151 (5): 775-82.
9. Armstrong GL, Hollingsworth J, Morris JG Jr. 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 (1): 29-51.
10. Chinen I, Tanaro JD, Miliwebsky E, Lound LH, Chillemi G, Ledri S, *et al.* Isolation and characterization of *Escherichia coli* O157:H7 from retail meats in Argentina. *J Food Prot* 2001; 64: 1346-51.
11. 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.
12. Paton JC, Paton AW. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clin Microbiol Rev* 1981; 11(3):450-79.
13. Schmidt H, Beutin L, Karch H. Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933. *Infect Immun* 1995; 63 (3): 1055-61.
14. 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 (3): 497-503.
15. 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 (3): 540-5.
16. Gannon VP, Rashed M, Kin RK, Thomas EJ. Detection and characterization of the *eae* gene of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* using polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 1268-74.
17. Karmali MA, Petric M, Lim C, Cheung R, Arbus GS. Sensitive method for detecting low numbers of verotoxin-producing *Escherichia coli* in mixed cultures by use of colony sweeps and polymyxin extraction of verotoxin. *J Clin Microbiol* 1985; 22 (4): 614-9.
18. Beutin L, Montenegro MA, Ørskov I, Ørskov 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 (11): 2559-64.
19. Ørskov I, Ørskov F. Serotyping of *Escherichia coli*. In: Bergan T, editor. *Methods in Microbiology*. London: Academic Press; 1984. p. 43-112.
20. Krishnan C, Fitzgerald VA, Dakin SJ, Behme RJ. Laboratory investigation of outbreak of hemorrhagic colitis caused by *Escherichia coli* O157:H7. *J Clin Microbiol* 1987; 25 (6): 1043-7.
21. 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. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 1339-43.
22. Ahmed R, Bopp C, Borczyk A, Kasatiya S. Phage-typing scheme for *Escherichia coli* O157:H7. *J Infect Dis* 1987; 155: 806-9.
23. Khakhria R, Duck D, Lior H. Extended phage-typing scheme for *Escherichia coli* O157:H7. *Epidemiol Infect* 1990; 105: 511-20.
24. Centers for Disease Control and Prevention. Standardized molecular subtyping of foodborne bacterial pathogens by pulsed-field gel electrophoresis: a training manual. Atlanta: National Center for Infectious Diseases, 1998.
25. Tarr PI, Hickman RO. Hemolytic uremic syndrome epidemiology: a population-based study in King County, Washington, 1971 to 1980. *Pediatrics* 1987; 80 (1): 41-5.
26. Siegler RL, Pavia AT, Christofferson RD, Milligan MK. A 20-year population-based study of postdiarrheal hemolytic uremic syndrome in Utah. *Pediatrics* 1994; 94 (1): 35-40.
27. Neill MA, Tarr PI, Clausen CR, Christie DL, Hickman RO. *Escherichia coli* O157:H7 as the predominant pathogen associated with the hemolytic uremic syndrome: a prospective study in the Pacific Northwest. *Pediatrics* 1987; 80 (1): 37-40.
28. Rivas M, Balbi L, Miliwebsky ES, Garcia B, Tous MI, Leardini NA, *et al.* Síndrome urémico hemolítico en niños de Mendoza, Argentina: asociación con la infección por *Escherichia coli*. *Medicina (B Aires)* 1998; 58 (1): 1-7.

29. Cordovez A, Prado V, Maggi L, Cordero J, Martinez J, Misraji A, *et al.* Enterohemorrhagic *Escherichia coli* associated with hemolytic-uremic syndrome in Chilean children. *J Clin Microbiol* 1992; 30 (8): 2153-7.
30. Paton AW, Paton JC. Direct detection and characterization of Shiga toxinogenic *Escherichia coli* by multiplex PCR for *stx1*, *stx2*, *eae*, *ehxA*, and *saa*. *J Clin Microbiol* 2002; 40 (1): 271-4.
31. Doughty S, Sloan J, Bennett-Wood V, Robertson M, Robins-Browne RM, Hartland EL. Identification of a novel fimbrial gene cluster related to long polar fimbriae in locus of enterocyte effacement-negative strains of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immunol* 2002; 70 (12): 6761-9.
32. 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. In: Kaper JB, O'Brien A, editors. *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin producing *E. coli* strains. Washington DC: ASM Press; 1998. p. 73-81.
33. Novillo AA, Voyer LE, Cravioto R, Freire MC, Castano G, Wainstein R, *et al.* Haemolytic uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and verotoxin neutralizing antibodies. *Pediatr Nephrol* 1988; 2 (3): 288-90.
34. Perez N, Rahman R, Zalba J, Bibiloni N, Lasarte P, Spizzirri F. Haemolytic uraemic syndrome and unpasteurized milk [Letter]. *Acta Paediatr* 1994; 83 (2): 42.
35. Dorn CR. Review of foodborne outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection in the western United States. *J Am Vet Med Assoc* 1993;203(11):1583-7.
36. Heuvelink AE, Van de Kar NC, Van Der Velden TJ, Chart H, Monnens LA. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* infection in household members of children with hemolytic-uremic syndrome in The Netherlands. *Pediatr Infect Dis J* 1999; 18 (8): 709-14.

**Aceptado para su publicación el 30 de enero de 2007**