Manual de procedimientos

Escherichia coli productor de toxina Shiga en el marco de la detección de E. coli diarreigénico

ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán"

INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS

DEPARTAMETO DE BACTERIOLOGÍA

SERVICIO FISIOPATOGENIA

CIUDAD AUTÓNOMA DE BUENOS AIRES, DICIEMBRE DE 2019

INEI
Instituto Nacional de
Enfermedades Infecciosas
"Dr. Carlos G. Malbrán"

ANLIS
MALBRÁN

Ministerio de Salud
Argentina

Miliwebsky E, Deza N, Zolezzi G, Baschkier A, Carbonari C, Manfredi E, D´Astek B, Chinen B, Rivas M. Manual de procedimientos: Escherichia coli productor de toxina Shiga en el marco de la detección de E. coli diarreigénico. Ciudad Autónoma de Buenos Aires: ANLIS Dr. C. G. Malbrán, 2019. (ANLIS/INEI/MP-ARG;2019)

Disponible en: http://sgc.anlis.gob.ar/handle/123456789/1682

"Este recurso es el resultado del financiamiento otorgado por el Estado Nacional, por lo tanto queda sujeto al cumplimiento de la Ley Nº 26.899 y la política de gestión del conocimiento de la ANLIS".

Este obra está bajo una Licencia CreativeCommonsAttribution 4.0 International (CC BY 4.0)

INEI
Instituto Nacional de
Enfermedades Infecciosas
"Dr. Carlos G. Malbrán"

ANLIS
MALBRÁN

Ministerio de Salud
Argentina

AUTORAS Y AUTORES:

Elizabeth Sandra Miliwebsky

Natalia Lorena Deza

Gisela Yanina Zolezzi

Ariela Baschkier

Claudia Carolina Carbonari

Eduardo Manfredi

Beatriz Alejandra D´Astek

Isabel Chinen

Marta Rivas

ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán"

INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS

DEPARTAMETO DE BACTERIOLOGÍA

SERVICIO FISIOPATOGENIA

CIUDAD AUTÓNOMA DE BUENOS AIRES, DICIEMBRE DE 2019

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN GENERAL

1.- Definición. Tipos de diarrea…….4
2.- Epidemiología de la enfermedad…….....4
3.- Patogenia.....7
4.- Situación actual del diagnóstico..... 9
5.- Referencias..... 10

CAPÍTULO I – CATEGORÍAS DE *Escherichia coli* DIARREIGÉNICO

1.-.Introducción.....11
1.1- *Escherichia coli* enteropatógeno (EPEC).....11
1.1.1- Serotipos…….. 13
1.1.2- Patogenia…… .13
1.1.3.- Mecanismos y factores de virulencia involucrados en la interacción de EPEC con la célula huésped…….....14
A.- Adherencia……14
A.1.- Adhesinas……..15
A.2.- Intimina…….....15
A.3.- EFA / LIF……..16
A.4.- Otras adhesinas…….....16
A.5.- Flagelos…….17
B.- Eventos de señalización……....17
B.1.- Sistema de Secreción Tipo Tres (T3SS)……...17
B.2.- LEE y efectores codificados no-LEE……17
B.3.- Autotransportadores……..19
B.4.- Regulación……19
C.- Invasión…….....19
1.1. 4- Diversidad de las propiedades de virulencia……....19
1.1.5.- Reservorio y transmisión……..20
1.1.6.- Aspectos clínicos……..20
1.1.7.- Respuesta inmune…….....21
1.1.8.- Diagnóstico……...21
1.1.9.- Tratamiento y profilaxis……..22

1.1.10.- Epidemiología e impacto en América Latina…….23

1.2- *Escherichia coli* enterotoxigénico (ETEC).....24
1.2.1- Serotipos.....24
1.2.2.- Patogenia……..25
1.2.3.- Mecanismos y factores de virulencia involucrados en la interacción de ETEC con la célula huésped……25
A.- Adherencia……....25
B.- Toxinas…….26
B.1.- Toxina termolábil (LT)…….....26
B.2.- Toxina termoestable (ST)…….....27
C.- Serina Proteasa Autotransportadora…….....28
1.2.4.- Reservorio y transmisión……..28
1.2.5.- Aspectos clínicos……..28
1.2.6.- Diagnóstico……...29
1.2.7.- Tratamiento……...29
A.- Infección pediátrica por ETEC…….....29
B.- Tratamiento de adultos con diarrea del viajero…….....29
1.2.8.- Medidas preventivas…….29
1.2.9.- Infecciones pediátricas por ETEC en América Latina…….....30

1.3- *Escherichia coli* enteroinvasivo (EIEC).....31
1.3.1- Serogrupos…….....31
1.3.2.- Patogenia……...31
1.3.3.- Mecanismos y factores de virulencia involucrados en la interacción de EIEC con la célula huésped……32
A.- Antígenos de invasión codificados en plásmido Ipa……....32
B.- IcsA y la propagación de célula a célula……..32
C.- Factor hemoaglutinante manosa-resistente (HAF)……...33
1.3.4.- Aspectos clínicos y tratamiento……....33
1.3.5.- Diagnóstico……...33
1.3.6.- Epidemiología……...34

1.4- *Escherichia coli* Enteroagregativo (EAEC)…….35
1.4.1- Serotipos……....36
1.4.2- Patogenia……...36

1.4.3.- Mecanismos y factores de virulencia involucrados en la interacción de EAEC con la célula huésped…….36
A.- Adherencia ……...36
A.1.- Adhesinas afimbriales 37
A.2.- Adhesinas fimbriales…….37
A.3.- Formación de biofilm……38
A.4.- Dispersina, Shf y Irp-2……..38
B.- Invasión…….38
C.- Elaboración de enterotoxinas y citotoxinas……...39
C.1.- Proteína Pet……....39
C.2.- Toxina termoestable enteroagregativa 1 (EAST1)……39
C.3.- Enterotoxina de Shigella 1 (ShET1)……..40
C.4.- Hemolisinas……...40
C.5.- Proteína implicada en la colonización (Pic)……..40
1.4.4.- Respuesta inmune……..41
1.4.5.- Diagnóstico……...42
1.4.6.-Tratamiento y profilaxis…….42
1.4.7.- Epidemiología e impacto en América Latina……43

1.5- *Escherichia coli* productor de toxina Shiga (STEC)

1.5.1- Serotipos……... 44
1.5.2- Patogenia……....45
1.5.3.- Mecanismos y factores de virulencia involucrados en la interacción de STEC con la célula huésped……..……47
1.5.4.- Reservorio y transmisión……..48
1.5.5.- Aspectos clínicos……..49
1.5.6.- Diagnóstico……...50
1.5.7.-Tratamiento y profilaxis…….....50
1.5.8.-Epidemiología e impacto en América Latina…….....51

CAPITULO II - AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE *Escherichia coli* DIARREIGÉNICO

1.-Especimenes…….53
2.-Procesamiento……..53

2.1.- Aislamiento……. .53
2.2- Identificación Bioquímica…….58
2.2.1- Fundamento y procedimientos para pruebas bioquímicas…….61
a) Agar hierro tres azúcares (TSI)……...61
b) Utilización de Citrato…….. 61
c) Utilización del Acetato……... 62
d) Sulfuro, indol, movilidad (SIM)……. 62
e) Movilidad, indol, ornitina (MIO)……... 63
f) Fermentación de hidratos de carbono (Medio Rojo Fenol)……... 64
g) Biotipificación de *E. coli* O157:H7…….65
h) Actividad β-glucuronidasa……..66
i) Actividad β-galactosidasa……...66
j) Lisina, Hierro, Agar (LIA)……66
k) Producción de pigmento amarillo……..67
2.3.- Serotipificación…….....68
2.3.1- Detección del antígeno somático O……68
A) Aglutinación en lámina con antisuero policlonal a-O……..68
2.3.2- Detección del antígeno flagelar H…….70
A) Prueba y estimulación de la movilidad……71
B) Identificación del antígeno H: Aglutinación en tubo……72
2.4- Sensibilidad a los antimicrobianos…….....73
2.5- Caracterización de cepas hemolíticas…….....75

CAPITULO II APÉNDICE

Algoritmo para el diagnóstico y caracterización de *Escherichia coli* diarreigénico STEC, EPEC, ETEC, EIEC y EAEC……77

CAPITULO III - DETECCION DE FACTORES DE VIRULENCIA

1.- Detección genotípica de los factores de virulencia por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo final……..78
A) Preparación de la muestra……79
B) Preparación de la mezcla de reacción……..80
C) Carga de los templados y amplificación……...81
D) Detección del producto de amplificación…….82

1.1.- PCR múltiple *stx*1/*stx*2/*rfb*O157…….....85

1.1.1.-Protocolo PCR múltiple *stx*1/*stx*2/*rfb*O157.....86

1.2.- PCR múltiple PCR múltiple *eae* / *lt* / *sth* / *stp*……88

1.2.1.-Protocolo PCR múltiple *eae* / *lt* / *sth* / *stp*……..90

1.3.- PCR múltiple *Ipa*H / *aggR* / *stx*1 / *stx*2…….....92

1.3.1-Protocolo PCR múltiple *Ipa*H / *aggR* / *stx*1 / *stx*2……94

1.4.- PCR factor *eae* …….....96

1.4.1-Protocolo PCR factor *eae*…….....97

1.5.- PCR variantes factor *eae*…….99

1.5.1-Protocolo PCR variantes factor *eae* ……...100

1.6.- PCR Bundle forming pilus de EPEC (*bfp*)…….....102

1.6.1-Protocolo PCR Bundle forming pilus de EPEC (*bfp*)…….....103

1.7.- PCR múltiple *lt* / *st*…….....105

1.7.1-Protocolo PCR múltiple *lt* / *st*…….....106

1.8.- PCR *IpaH*…….....108

1.8.1- Protocolo PCR *IpaH* ……109

1.9.- PCR pCVD432 (EAEC)…….111

1.9.1- Protocolo pCVD432 (EAEC)……112

1.10.- PCR *aaiC*…….114

1.10.1- Protocolo PCR *aaiC*……115

1.11.- PCR *stx*1.....117

1.11.1- Protocolo PCR *stx*1.....118

1.12.- PCR *stx*2…….....120

1.12.1- Protocolo PCR *stx*2……...121

2.- Detección genotípica de los factores de virulencia por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real. ……123

A) Preparación de la muestra……...124

B) Preparación de la mezcla de reacción…….. ..125

C) Carga de los templados y amplificación…….....126

D) Detección del producto de amplificación……...127

2.1.- PCR múltiple en tiempo real: mRT-PCR *stx*1 / *stx*2…….....128

2.1.1.-Protocolo PCR múltiple *stx*1/*stx*2.....128

CAPITULO III - APENDICE

FIGURA 1: Áreas de trabajo en el laboratorio de PCR……130
1A- Área de procesamiento de la muestra y obtención del ADN…….....130
1B- Área de preparación de la mezcla de reacción…….130
1C- Área para el agregado del templado y amplificación…….....131
1D-Área de detección de los productos de amplificación…….....131
Composición y preparación de reactivos para PCR…….....132
1.- Buffer PCR 10X……..132
2.- Cl_2Mg 25 ó 50 mM……..132
3.- Nucleótidos trifosfatos.....132
4.- Primers.....132
5.- Buffer Tris-EDTA (TE).....132
6.- Buffer Tris-Acetato EDTA (TAE)…….....133
7.-Buffer de siembra 1……..134
8.-Buffer de siembra 2……..134

CAPITULO IV- DIAGNÓSTICO INDIRECTO

1.- ELISA para la detección de anticuerpos a-O157, a-O145, a-O121 y a-O103……..135
2- Procedimiento de ELISA. Seguir las instrucciones del fabricante……137

ANEXO I- MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS

ANEXO II -REFERENCIAS

INTRODUCCIÓN GENERAL

A nivel mundial, la enfermedad diarreica constituye un problema grave para la salud pública de infantes y niños, con altas tasas de morbilidad y mortalidad, especialmente en países de bajos y medianos ingresos *per capita* de África, Asia y América Latina [1]. De acuerdo a datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), se estima que en todo el mundo se producen unos 1700 millones de casos de enfermedad diarreica cada año [2]. En los países pobres, se ha estimado que cada niño sufre una media de tres episodios de diarrea por año. Dependiendo de los países, se considera que del 15 al 70% de esos casos son causados por alimentos, incluyendo al agua, que sufrieron contaminación microbiológica.

Tanto la incidencia como el riesgo de mortalidad por patología diarreica son más frecuentes en niños menores de cinco años. Según la OMS, las enfermedades diarreicas son la segunda causa de muerte de niños menores de cinco años, y ocasionan la muerte de más de 500.000 niños cada año. La mayor tasa de letalidad ocurre sobre todo entre los seis meses y los dos años de edad. Los lactantes y niños menores desarrollan deshidratación más rápidamente, por ello, aproximadamente el 85% de las muertes por diarrea ocurren en niños menores de un año. A comienzos de los 80s, se realizaron enormes esfuerzos a nivel mundial para lograr una reducción sustancial de la mortalidad asociada a diarrea. Estos esfuerzos se basaron en el reconocimiento que la rehidratación oral temprana en la fase aguda juega un importante papel en la reducción de la evolución fatal de la enfermedad, implementándose la misma a través de programas nacionales de control de las diarreas. El estado de hidratación del paciente define el tratamiento inicial. En casos de deshidratación de leve a moderada, sin vómitos, se recomienda la vía oral con sales de rehidratación. La vía endovenosa se reserva para aquellos pacientes en que la vía oral ha fracasado, y en aquellos casos con deshidratación severa (más del 10%), con aporte de agua y electrolitos acorde a estudios de laboratorio y presentación clínica.

En niños mayores y en adultos, la mayoría de las infecciones entéricas son asintomáticas por el desarrollo de inmunidad activa, lo cual evita que algunas infecciones intestinales se manifiesten clínicamente. Esta portación asintomática puede durar varios días o semanas, evento de importancia epidemiológica, ya que esos portadores eliminan en sus heces virus, bacterias o quistes de protozoos, con la consiguiente diseminación de los mismos si no se toman las precauciones higiénicas adecuadas.

Entre otras consecuencias de la diarrea infantil, en países con recursos limitados se incluyen, desnutrición, disminución del crecimiento y alteración del desarrollo cognitivo. En los países industrializados, son relativamente pocos los pacientes que mueren por diarrea, pero sigue siendo una causa importante de morbilidad y costos en salud.

Hay ciertos factores que pueden considerarse de riesgo para adquirir una diarrea, tanto inherentes a condiciones del paciente como a condiciones socioeconómico-sanitarias. Entre los factores de riesgo se pueden señalar:

1. factores inherentes al paciente: a) edad menor a un año; b) falta de lactancia materna exclusiva durante los primeros 6 meses de vida; c) uso de biberones; d) desnutrición; e) inmunosupresión; f) uso de antibióticos.
2. factores ambientales y familiares: a) hacinamiento; b) convivientes con enfermedad diarreica; c) condiciones higiénicas deficientes; d) inaccesibilidad al agua potable; e) sistema de eliminación de excretas ineficiente; f) imposibilidad de refrigerar alimentos; g) bajo nivel de comprensión materna o madre adolescente; h) analfabetismo y desocupación; i) dificultad de acceso a la información o a los servicios de salud.

Dichos factores favorecen los procesos infecciosos que desencadenarán el cuadro clínico, muchas veces con consecuencias letales.

También existen factores protectores., entre los que se puede señalar: a) lactancia materna exclusiva durante un mínimo de 6 meses; b) alimentación complementaria adecuada a partir de los 6 meses; c) medidas higiénicas adecuadas; d) educación; y e) vacunación en el caso de Rotavirus.

Las infecciones entéricas, tanto las de etiología comprobada como las enteritis indiferenciadas, tienen mecanismos de transmisión comunes:

a) Transmisión directa: por contacto persona a persona por la ruta fecal-oral.

b) Transmisión indirecta: a través de agua o alimentos contaminados.

Las diarreas de origen infeccioso pueden ser de etiología bacteriana, viral o parasitaria, siendo frecuentes las asociaciones de dos o más agentes. Entre los agentes bacterianos se puede señalar a *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Vibrio cholerae*, *Yersinia* spp., *Campylobacter* spp. *Clostridium difficile* y *Escherichia coli* diarreigénico, entre otros.

El género *Escherichia* es un miembro de la familia *Enterobacteriaceae* [3], y la especie *Escherichia coli* como parte de este género, está ampliamente distribuida en la naturaleza. Fue descrita por primera vez en 1885 por el pediatra alemán Theodore von Escherich, quien la denominó *Bacterium coli* [4]. Posteriormente, la taxonomía le adjudicó el nombre de *Escherichia coli*, en honor a su descubridor.

Escherichia coli es un bacilo Gram negativo, oxidasa negativo, anaerobio facultativo, con un metabolismo tanto fermentativo como respiratorio, no móvil o móvil por flagelos peritricos. Constituye el habitante facultativo más importante del intestino grueso, tanto del hombre como de animales de sangre caliente, y como parte de la microbiota mantiene la fisiología en el hospedador sano. La colonización comienza en el nacimiento, pero la maduración de la microflora es un proceso continuo que dura varios años, y *E. coli* es uno de los primeros organismos facultativos en colonizar el intestino humano [5]. Se estima que el 1-4% de todas las bacterias cultivables del colon corresponden a *E. coli*, pudiéndose detectar hasta 10^{10} UFC / g de heces [6].

Fisiológicamente, *E. coli* es versátil y se adapta a las características del hábitat, pudiendo crecer en un medio con glucosa como única fuente orgánica. Puede crecer en presencia o ausencia de O_2. En condiciones anaerobias, puede proliferar por fermentación, produciendo una mezcla de ácidos y gas como productos finales. También puede crecer por medio de la respiración anaeróbica, ya que es capaz de utilizar NO_3, NO_2 o fumarato como aceptores finales de electrones. Esta versatilidad de *E. coli* le confiere la capacidad de adaptarse al hábitat intestinal (anaeróbico) y extraintestinal (aeróbico o anaeróbico) [7].
La mayoría de las cepas de *E. coli* no son patógenas; sin embargo, algunas de ellas pueden ser patógenos oportunistas que causan infecciones intestinales y extraintestinales, tanto en individuos inmunocompetentes como inmunocomprometidos.

La diversidad patogénica de *E. coli* es el resultado de la adquisición o pérdida de genes por transferencia horizontal, que le confiere propiedades de virulencia. La adquisición de genes de virulencia, a menudo localizados en elementos genéticos móviles, como transposones, secuencias de inserción, bacteriófagos y plásmidos, le proporciona a *E. coli* una serie de nuevos atributos; mientras que la pérdida de genes puede favorecer la adaptación de *E. coli* en un nicho particular [8]. Kaper et al. (2004) [9] han definido el término patotipo y/o virotipo como "grupo de cepas de una sola especie que causa una enfermedad definida a través de un conjunto común de factores de virulencia". Solo aquellas combinaciones exitosas de factores de virulencia han podido persistir a través de los años y convertirse en patotipos específicos, representando una familia de cepas de *E. coli* que comparten determinantes de virulencia específicas.

Las cepas que causan infecciones extraintestinales se agrupan en tres patotipos: *E. coli* causante de septicemia (SCEC), *E. coli* que causa meningitis neonatal (NMEC), y *E. coli* uropatogénico (UPEC), que produce infecciones del tracto urinario (ITU).

Con el nombre de *Escherichia coli* diarreigénico (DEC) se denomina a un grupo heterogéneo de cepas que poseen distintos factores de virulencia y distinta interacción con la mucosa intestinal del hospedador, causan diferentes síndromes diarreicos y tienen distinta epidemiología. Las cepas DEC son causa importante de morbi-mortalidad en los países en vías de desarrollo. Hasta el presente se reconocen cinco categorías o patotipos: *E. coli* enteropatógeno (EPEC), *E. coli* enterotoxigénico (ETEC), *E. coli* enteroinvasivo (EIEC), *E. coli* enteroagregativo (EAEC) y *E. coli* productor de toxina Shiga (STEC). Ha sido propuesta una sexta categoría, llamada *E. coli* de adherencia difusa (DAEC), aunque la capacidad patogénica y la implicancia epidemiológica de estas cepas todavía no está lo suficientemente dilucidada [10]. Se ha descripto un nuevo patotipo, denominado *E. coli* adherente invasivo (AIEC), propuesto como uno de los agentes potenciales de la enfermedad de Crohn [8, 11]. Muchos de los patotipos de DEC poseen bajas dosis infectivas y se transmiten a través de alimentos y agua.

1.- Definición. Tipos de diarrea

La diarrea se define como un síndrome clínico de etiología diversa producido por una alteración en el transporte y absorción de electrolitos y agua, que genera el incremento en el número de deposiciones diarias y la alteración en la consistencia de las heces, acompañado de otros síntomas como vómitos, náuseas, dolor abdominal o fiebre. Su duración es variable, aunque generalmente está limitada a una semana.

Las enfermedades diarreicas pueden dividirse en tres cuadros clínicos:

3. Diarrea aguda acuosa o secretora: el microorganismo después de colonizar, se multiplica en el lumen intestinal, fundamentalmente a nivel de intestino delgado superior. En ese sitio, por secreción de una enterotoxina citotóxica o bien por reducción de la superficie de absorción, se produce una alteración del flujo bidireccional de agua y electrolitos dando por resultado una diarrea acuosa, con leucocitos escasos o ausentes (0 a 5 por campo) en el extendido de materia fecal. El principal riesgo es la deshidratación. Ejemplos: *V. cholerae*, *E. coli* enterotoxigénico (ETEC), Rotavirus, virus de tipo Norwalk, *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp. Los cambios en la flora intestinal provocados por antibióticos pueden ocasionar diarrea aguda por proliferación de *Clostridium difficile* y producción de su toxina.
4. Diarrea aguda sanguinolenta (disentería): el microorganismo, después de adherirse a nivel del intestino delgado distal o de colon, puede penetrar la línea epitelial del intestino. Su multiplicación dentro de la mucosa o la liberación de una citotoxina, causa la destrucción parcial o total de la célula. Se produce una diarrea disentérica con sangre, pus y una severa respuesta inflamatoria con abundantes leucocitos polimorfonucleares detectables en la examinación microscópica de las heces (más de 20 por campo). Los principales riesgos son el daño intestinal, septicemia y malnutrición. Pueden presentarse otras complicaciones como la deshidratación. Ejemplos: *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Campylobacter* spp., *Clostridium difficile* y *E. coli* enteroinvasivo (EIEC), y *E. coli* productor de toxina Shiga (STEC), entre otros.
5. Diarrea persistente o prolongada: persiste más de 14 días, El principal riesgo que entraña es la malnutrición y la infección extraintestinal grave, también puede presentarse deshidratación. Ejemplo: *E. coli* enteroagregativo (EAEC).

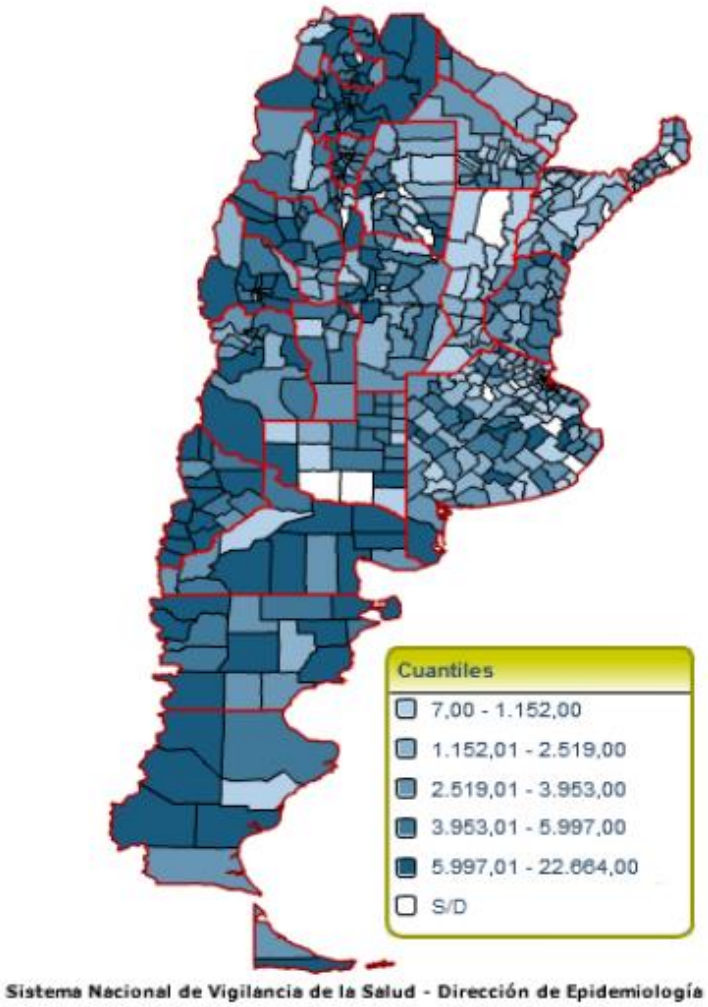
2.- Epidemiología de la enfermedad

En Argentina, la notificación de los casos de diarrea aguda es obligatoria, semanal y agrupada al Sistema Nacional de Vigilancia de la Salud (SNVS2.0), en la Plataforma SISA (Sistema Integrado de Información Sanitaria Argentino). Todos los registros de los sectores involucrados en las acciones de prevención, promoción, investigación y control de los eventos a vigilar se realizan en una misma plataforma en tiempo

real. La notificación comienza por la identificación del ciudadano en el RENAPER. Este sistema integra la información clínica, epidemiológica y del laboratorio.

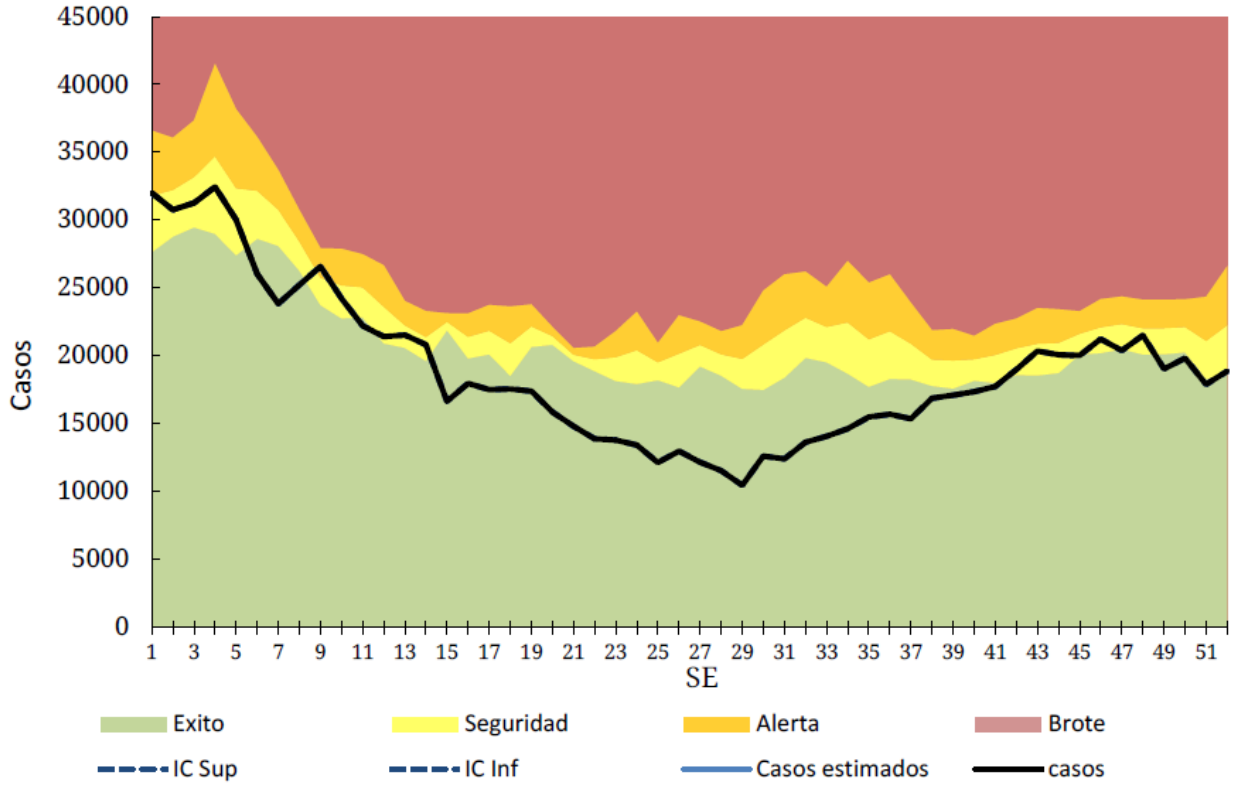
En 2017 fueron notificados un total de 987.566 casos con una tasa de 2219,52 casos por 100.000 habitantes (Boletín Integrado de Vigilancia | N° 397– SE 05 2018| Página 49-50). Se observó una gran diferencia en las tasas de notificación de las distintas regiones, algunas como el NOA (5042,77/100 .000 habitantes) y el Sur (4101,70/100.000 habitantes), presentaron tasas más elevadas que las regiones de Cuyo (3406,38/100.000 habitantes), NEA (1934,78/100.000 habitantes), y Centro (1398,40/100.000 habitantes). Las tasas acumuladas más elevadas correspondieron a las provincias de Salta (6779,46/100.000 habitantes), Jujuy (5654,66//100.000 habitantes), Tierra del Fuego (5311,50/100.000 habitantes), Neuquén (4788,46/100.000 habitantes) y Tucumán (4632,05/100.000 habitantes). En la Figura 1 se presentan las Tasas de Diarreas Agudas por 100.000 habitantes. Total país. SE 1 a 52 de 2017. Argentina.

Figura 1



Durante el 2017 se verificaron variaciones en los diferentes momentos del año respecto del registro histórico del período 2012-2016. En el corredor endémico para el total país del año 2017 se observó que, durante la semana epidemiológica (SE) 9, la notificación se ubicó en zona de Alerta. En el resto del año la notificación alternó entre zona de Seguridad, y zona de Éxito. En la Figura 2 se presenta el Corredor endémico semanal de diarreas agudas. 2017. Total país. Históricos 5 años: 2012 a 2016.

Figura 2



Fuente: Sistema Nacional de Vigilancia de la Salud- Dirección de Epidemiología

La vigilancia basada en laboratorio se realiza a través de la Red Nacional de Diarreas y Patógenos Bacterianos de Transmisión Alimentaria. Dicha Red tiene como misión fortalecer el sistema de vigilancia de las diarreas y de los patógenos de transmisión alimentaria a través de la organización de los laboratorios de las áreas humana y de alimentos, integrados a un sistema multidisciplinario y trabajando bajo normas de gestión de calidad reconocidas, de manera de obtener un diagnóstico microbiológico confiable, oportuno y reproducible para ser utilizado en el mejoramiento de la atención del paciente y en la prevención de brotes. Está integrada por los Laboratorios de Referencia Nacional que funcionan en el Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas – ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán", y 544 laboratorios de distintos niveles de complejidad que integran las Redes Jurisdiccionales.

3.- Patogenia

La diarrea aguda infecciosa se produce cuando un microorganismo o en algunos casos sus toxinas preformadas, ingresan al organismos del hospedador, resisten los mecanismos de defensa y alcanzan el tracto gastrointestinal.

Entre los mecanismos de defensa del hospedador se pueden señalar:

1. en boca: actividad antimicrobiana de la saliva.
2. en estómago: pH ácido.
3. en intestino: peristaltismo, secreción de mucus, producción de sustancias antimicrobianas (lactoferrinas, IgA secretoras, etc.), competencia con la flora normal.

Después que el patógeno entérico ha alcanzado la superficie de la mucosa, existen distintos mecanismos para establecer la diarrea, dependiendo de la capacidad intrínseca del microorganismo de colonizar, de invadir o de la naturaleza de las toxinas que produce.

Ciertas bacterias colonizan y causan una infección extracelular, secretando enzimas y/o toxinas de acción local o sistémica. Otras bacterias pueden invadir el epitelio, multiplicarse dentro de la célula, provocar su muerte y causar una respuesta inflamatoria. También pueden pasar la barrera epitelial y establecerse en los macrófagos a nivel de mucosas, lo que representa el punto inicial de su diseminación sistémica.

Los puntos estratégicos de la infección bacteriana se inician con la asociación a la mucosa intestinal, la cual consta de dos etapas:

1. *Quimiotactismo*: proceso por el cual la bacteria se une a proteínas de superficie que pertenecen a la matriz de la célula epitelial. Esta propiedad le permite a la bacteria establecerse en las proximidades de la célula del hospedador y algunas veces colonizar tejidos subyacentes como la membrana basal y estructuras conectivas.
2. *Adherencia*: interacción específica entre un ligando expresado por la bacteria (adhesina) y un receptor de superficie de la célula epitelial. La adherencia es característica de las bacterias gram-negativas, que expresan en su superficie estructuras conocidas como pili o fimbrias, o componentes de la superficie bacteriana. Las adhesinas son generalmente proteínas, capaces de reconocer residuos de azúcares en glicoproteínas o glicolípidos. El proceso de adherencia, a pesar de ser altamente eficiente, no media la internalización del patógeno a la célula del hospedador, pero afecta significativamente la respuesta inflamatoria. Esto es importante, ya que la adherencia *per se* no solo permite la colonización, sino que representa una etapa muy temprana de señalamiento que facilita la respuesta inflamatoria, componente principal en la enfermedad infecciosa.

Otros factores que intervienen en la patogenia son:

Toxinas: pueden ser citotóxicas o citotóxicas. Las toxinas citotónicas inducen la secreción de agua y electrolitos, sin dañar la mucosa epitelial. Las toxinas citotóxicas producen daño y muerte celular.

Invasividad: está mediada por proteínas de superficie. Le permite a la bacteria invadir y multiplicarse en la célula intestinal provocando su destrucción. El epitelio intestinal es una barrera eficiente que evita la invasión bacteriana por mecanismos tales como el peristaltismo, secreción de mucus, producción de sustancias antibacterianas, las microvellosidades, estructura altamente diferenciada en el polo apical del enterocito, y las uniones estrechas entre células que sellan eficientemente la vía paracelular. En caso de falla de estas estructuras, los macrófagos ubicados en el polo basal de la capa epitelial pueden fagocitar y destruir a las bacterias que traslocan la barrera epitelial. Sin embargo, hay ciertas estructuras especializadas en el epitelio intestinal que pueden permitir la entrada de los patógenos bacterianos. Las placas de Peyer del ileón y los folículos linfoides del colon y recto son estructuras linfoides intramucosales, cubiertas por parte del epitelio intestinal, que contienen a las células M. Estas células especializadas en translocar antígenos que están presentes en reservorios formados dentro de estas células M. Los folículos adyacentes son un reservorio de células inmunocompetentes a nivel de las cuales se ejerce la inmunoprotección en mucosas, particularmente por inducción de linfocitos productores de IgA que poseen plasmocitos secretores de IgA (sIgA). Ciertos patógenos invasivos (*Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Yersinia* spp.) pueden usar a las células M para cruzar la barrera epitelial. Sin embargo, algunas especies bacterianas son naturalmente invasivas *per se*, pudiendo penetrar, sobrevivir, y multiplicarse dentro de la célula eucariota provocándole su muerte. La presencia de uno o más de los factores señalados en los puntos anteriores es esencial para el establecimiento de la diarrea.

Los microorganismos, después de adherirse a la mucosa intestinal, pueden provocar las diarreas por un mecanismo particular, en base al cual se los puede clasificar en cinco categorías:

1. *Por adherencia a la mucosa intestinal y producción de una enterotoxina*: la bacteria después de adherirse a la mucosa a nivel del intestino delgado superior, produce una enterotoxina que induce la secreción neta de agua y electrolitos. No hay destrucción de las microvellosidades, ni invasión, ni lesiones histopatológicas reconocibles. Ejemplos: *V. cholerae*, *E. coli* enterotoxigénico (ETEC).
2. *Por adherencia a la mucosa intestinal y destrucción de las microvellosidades*: la bacteria después de adherirse produce una lesión hispotatológica característica, con destrucción de las microvellosidades y reducción de la superficie absortiva provocando secreción neta, sin invasión. Ejemplos: *E. coli* enteropatógeno (EPEC), *E. coli* productor de toxina Shiga (STEC).
3. *Por invasión de la mucosa y multiplicación intraepitelial:* la bacteria invade el enterocito a nivel del ileón o colon, se multiplica y produce la disfunción o muerte celular. Algunos microorganismos permanecen localizados dentro de la célula epitelial, mientras que otros pasan a lámina propia pero sin diseminación. Es raro que se produzca adenitis mesentérica o bacteriemia. Ejemplos: *Shigella* spp., *E. coli* enteroinvasivo (EIEC).
4. *Por translocación a nivel de mucosa y proliferación en lámina propia y nódulos mesentéricos:* la bacteria invade el enterocito y alcanza la lámina propia en vesículas pinocíticas induciendo una

respuesta quimiotáctica. La infección sistémica y la bacteriemia son raras, salvo en el huésped inmunocomprometido. Ejemplos: *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Yersinia enterocolitica*.

5. *Por translocación e infección generalizada:* Es un mecanismo semejante al anterior, la bacteria después de inducir una respuesta quimiotáctica es fagocitada por los macrófagos y drenada a los nódulos linfáticos mesentéricos, provocando bacteriemia al alcanzar el torrente sanguíneo. Ejemplos: *Salmonella* Typhi, *Salmonella* Paratyphi A y B.

4.- Situación actual del diagnóstico

El coprocultivo no es un estudio de rutina en todos los pacientes. En Argentina, las instituciones hospitalarias siguen diferentes protocolos para la indicación de coprocultivo ante un caso de diarrea. Se debe solicitar fundamentalmente en pacientes menores de 5 años con diarrea con sangre, pacientes inmunocomprometidos, neonatos, cuadros disentéricos graves, sospecha de bacteriemia, infección diseminada, y ante sospecha de brote. El estudio virológico de materia fecal está indicado para determinación etiológica en casos de focos de gastroenteritis en niños internados, o en jardines maternales o de infantes o en sospecha de brotes. El examen en fresco de materia fecal es útil ante la sospecha de infección por parásitos: *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica* en zona endémica, o *Cryptosporidium* en pacientes con inmunodeficiencias.

El diagnóstico microbiológico a nivel de género/especie de los enteropatógenos más frecuentemente asociados a diarrea, como *Salmonella* spp., *Shigella* spp. y *Campylobacter* spp. se realiza mediante técnicas de cultivo y métodos fenotípicos, utilizando pruebas bioquímicas convencionales y ensayos de seroagrupamiento o serotipificación. Los laboratorios de diagnóstico clínico a nivel local están capacitados para realizar dicha identificación. Laboratorios de mayor complejidad, a nivel de referencia provincial y nacional complementan la caracterización a través de métodos moleculares de los factores de virulencia. Sin embargo, es importante destacar que solo en el 20% aproximadamente de los casos de diarreas bacterianas se identifican patógenos usando las técnicas microbiológicas convencionales. Este bajo porcentaje de positividad está indicando que un grupo importante de patógenos bacterianos quedan sin identificar debido a la carencia de reactivos que permitan alcanzar un diagnóstico certero y oportuno que garantice un manejo clínico adecuado del paciente y la investigación epidemiológica correspondiente.

Se debe destacar que el diagnóstico de las diferentes categorías de *E. coli* diarreigénico no puede ser realizado por métodos fenotípicos convencionales, ya que presentan características bioquímicas indistinguibles de cepas de *E. coli* comensales. Por ello, es necesario disponer de un procedimiento diagnóstico específico dirigido a la detección de los factores de virulencia utilizando métodos moleculares o métodos de inmunodiagnóstico.

5.- Referencias

1. World Health Organization. World Health Statistics. Geneva, Switzerland: WHO Press 2014.
2. Organización Mundial de la Salud. Enfermedades diarreicas. Centro de Prensa, Nota Descriptiva. Mayo de 2017. Disponible en: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs330/es/. (Último acceso 30 de marzo de 2018).
3. Ewing WH. Edwards and Ewing's Identification of *Enterobacteriaceae*. 4th ed. New York: Elsevier Science Publishing Co. Inc., 1986:92-134.
4. Escherich T. Die darmbakterien des neugeborenen und sauglings. Fortshr Med 1885, 3:5-15-522,47-54.
5. Yatsunenko T, Rey FE, Manary MJ, et al. Human gut microbiome viewed across age and geography. Nature 2012;486:222-7.
6. Selander RK, Musser JM, Caugant DA, Gilmour MN, Whittam TS. Population genetics of pathogenic bacteria. Microbial Pathog 1987;3:1-7.
7. Shiloach J, Reshamwala S, Noronha SB, Negrete A. Analyzing metabolic variations in different bacterial strains, historical perspectives and current trends - example *E. coli*. Curr Opin Biotechnol 2010;21:21-6.
8. Croxen MA, Law RJ, Scholz R, et al. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli.* Clin Microbiol Rev 2013;26:822-80.
9. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HLT. Pathogenic *Escherichia coli*. Nat Rev Microbiol 2004;2:123-40.
10. Rivas M, Miliwebsky E, D'Astek B. Diagnóstico y caracterización de *Escherichia coli* diarreigénico. En: Lopardo H, Predari SC, Vay C, editores. Manual de Microbiología Clínica de la Asociación Argentina de Microbiología, Volumen I, Bacterias de importancia clínica. Buenos Aires, Asociación Argentina de Microbiología, www.aam.org.ar, 2016, p. 11-73.
11. Rolhion N, Darfeuille-Michaud A. Adherent-invasive *Escherichia coli* in inflammatory bowel disease. Inflamm Bowel Dis 2007;13:1277-83.

CAPÍTULO I – CATEGORÍAS DE *Escherichia coli* DIARREIGÉNICO

1.- Introducción

Con el nombre de *Escherichia coli* diarreigénico (DEC) se denomina a un grupo heterogéneo de cepas que poseen distintos factores de virulencia y distinta interacción con la mucosa intestinal del hospedador, causan diferentes síndromes diarreicos y tienen distinta epidemiología. Las cepas DEC son causa importante de morbi-mortalidad en los países en vías de desarrollo. Hasta el presente se reconocen cinco categorías o patotipos: *E. coli* enteropatógeno (EPEC), *E. coli* enterotoxigénico (ETEC), *E. coli* enteroinvasivo (EIEC), *E. coli* enteroagregativo (EAEC) y *E. coli* productor de toxina Shiga (STEC). Ha sido propuesta una sexta categoría, llamada *E. coli* de adherencia difusa (DAEC), aunque la capacidad patogénica y la implicancia epidemiológica de estas cepas todavía no está lo suficientemente dilucidada.

1.1- *Escherichia coli* enteropatógeno (EPEC)

Los primeros estudios epidemiológicos que sugieren que ciertas cepas de *E coli* son agentes causales de diarrea severa en la infancia fueron publicados a finales del siglo 19 [Robins-Browne et al., 1987]. En los años siguientes, diversos estudios reportaron la asociación de ciertas cepas de *E. coli*, de serogrupos específicos, con la diarrea infantil en Europa y los Estados Unidos [Robins-Browne et al., 1987; Levine et al., 1983]. Sin embargo, el reconocimiento de *E. coli* como agente causal de diarrea humana, fue realizado por John Bray [Bray et al., 1945], quien describió la asociación de cepas de *Escherichia* antigénicamente homogéneas con brotes de diarrea infantil ("diarrea de verano") en Inglaterra. En ese mismo período, Varela et al. [Varela et al., 1946] describió la asociación de una cepa de *E. coli* llamada (*E. coli-gomez*), con un caso de diarrea mortal en un niño en México. Posteriormente, distintos estudios realizados utilizando infecciones experimentales, corroboraron el potencial papel etiológico de ciertas cepas de *E. coli* en las enfermedades diarreicas [Levine et al., 1987].

En 1955, Neter et al [Neter et al., 1955], crearon el término *E. coli* enteropatógeno (EPEC) para designar a aquellas cepas de *E. coli* relacionadas epidemiológicamente con la diarrea infantil y diferenciarlas de las cepas de *E. coli* de la flora normal. Sin embargo, a pesar que EPEC fue el primer patotipo de *E. coli* diarreigénico identificado, su potencial patogénico fue confirmado y ampliamente aceptado cuando se demostraron síntomas evidentes de diarrea mediante experimentos de infección oral en voluntarios [Levine et al., 1978].

Hasta la década del 70, debido a la asociación epidemiológica de cepas de *E. coli* de ciertos serogrupos y serotipos con diarrea, el seroagrupamiento y/o la serotipificación fue el único método disponible para la identificación de EPEC y su diferenciación de cepas de *E. coli* no patógenas [Levine et al., 1987].

El desarrollo de técnicas de biología molecular y los ensayos en distintas líneas celulares han aportado gran información acerca de los factores y mecanismos de virulencia de EPEC [Nataro et al., 1998]. En la actualidad, el patotipo EPEC se divide en EPEC típico (tEPEC) y EPEC atípico (aEPEC). Esta clasificación se basa en la presencia del factor de virulencia EAF, asociado a la adherencia y codificado en el plásmido pEAF, presente en tEPEC, y ausente en aEPEC [Kaper et al., 1996].

Ambos grupos producen una lesión característica en las células intestinales conocida como A/E (del inglés, *attaching/effacing*), de adherencia y borrado de las microvellosidades, que resulta de la acción cooperativa de proteínas codificadas en un isla de patogenicidad denominada locus LEE (del inglés, *locus of enterocyte effacement*). Además, las cepas tEPEC y aEPEC carecen de los genes que codifican para las toxinas Shiga (Stx) de STEC, para las toxinas termolábiles y termoestables de ETEC, y no son invasivas [Kaper et al., 1996].

Hasta la década de 1990, las cepas tEPEC fueron los principales agentes causantes de diarrea aguda en niños muy pequeños en países en desarrollo, incluidos los países de América Latina. En la actualidad hay una clara disminución de su frecuencia en muchos de estos países [Chen et al., 2005; Trabulsi et al., 2002]. Por el contrario, las cepas aEPEC, que son agentes importantes de diarrea en países desarrollados desde la década de 1960, son emergentes de diarrea aguda y persistente, afectando a niños y adultos en todo el mundo [Nataro et al., 1998; Trabulsi et al., 2002; Hernandes et al 2009]. Las principales características de tEPEC y aEPEC se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1: Principales características de cepas EPEC típicas y atípicas

Características	**EPEC típica**	**EPEC atípica**
Serotipos más comunes	O55:H6, O55:NM[a], O86:H34, O111ab:H2, O111ab:NM, O119:H6, O127:H6, O127:H40, O142:H6, O142:H34	O26:H11, O55:H7, O55:H34, O86:H8, O111ac:H9, O111:H25, O119:H2, O125ac:H6, O128ab:H2
Lesión A/E	Si	Si
Plásmido EAF (expresión BFP)	Presente	Ausente
Genes *stx*	No	No
Patrones de Adherencia	LA[b]	LA, LAL[c], AA[d], DA[e]
Isla de Patogenicidad LEE	Presente	Presente
Regulación	*per, ler, quorum sensing*	*ler, quorum sensing*
Reservorio	Humanos	Humanos, animales

[a]NM, no móvil.

Patrones de Adherencia en células HeLa/HEp-2: [b]LA, Adherencia localizada; [c]LAL, Adherencia-simil localizada; [d]AA, Adherencia agregativa, [e]DA, Adherencia difusa.

1.1.1- Serotipos

En 1987, la Organización Mundial de la Salud [Tikhomirov et al., 1987] definó como EPEC a las cepas de *E. coli* pertenecientes a 12 diferentes grupos O, también conocidos como serogrupos clásicos: O26, O55, O86, O111, O114, O119, O125, O126, O127, O128, O142, O158. Actualmente, se sabe que algunos serotipos dentro de estos serogrupos pueden comprender tanto cepas EPEC típicas y atípicas, como de otros patotipos diarreigénicos [Campos et al., 2004; Elias et al., 2002].

Entre las cepas tEPEC clásicas los serotipos más frecuentes son: O55:H6, O55:NM (no móvil), O86:H34, O111ab:H2, O111ab:NM, O119:H6, O127:H6, O127:H40, O142:H6, y O142:H34. Al estudiarse por multilocus enzimático (MLEE) y otros métodos moleculares, la mayoría de estos serotipos correspondieron a clones genéticamente relacionados [Trabulsi et al., 2002; Campos et al., 2004]. Sin embargo a lo largo de los años la frecuencia de estos serotipos ha cambiado y algunos serotipos de EPEC no-clásicos han sido identificados como tEPEC por ejemplo: O88:H25, y O145:H45 [Gomes et al., 1989]. En cuanto a las cepas aEPEC, diversos estudios epidemiológicos realizados en diferentes áreas geográficas han informado una gran diversidad antigénica, con al menos 109 serogrupos diferentes y más de 200 tipos de H diferentes [Hernandes et al., 2009]. Los serogrupos aEPEC más frecuentes son O26, O51, O55, O111, O145, y O119, mientras que los serotipos más frecuentes son O26:H11, O55:H7, O55:H34, O86:H8, O111ac:H9, O111:H25, O119: H2, O125ac:H6, y O128ab:H2 [Hernandes et al., 2009; Torres et al., 2005]. Un número considerable de cepas aEPEC son O y/o H no tipificables, y muchas son inmóviles.

1.1.2.- Patogenia

Después de pasar por la barrera gástrica, las cepas EPEC se adhieren a la mucosa del intestino delgado y grueso, determinando complejas alteraciones que conducen a la diarrea. El proceso de colonización se divide en tres fases [Nataro et al., 1998]. La primera fase es superficial y no íntima, y los factores que median la adherencia inicial no han sido totalmente caracterizados, pero algunos estudios indican la posible participación de fimbrias tipo IV, llamadas BFP (del inglés, *bundle forming pilus*), otras estructuras fimbriales y afimbriales menos caracterizadas, como así también los flagelos, lo que indica que este fenómeno es multifactorial [Girón et al., 1993; Kaper et al., 2004]. Después de la adherencia inicial, participa un sistema de secreción tipo III (T3SS) que codifica varias proteínas efectoras, cuyos efectos de señalización promueven diversas alteraciones en el epitelio del hospedador.

Por último, existe una adherencia íntima que culmina con la lesión A/E. Morfológicamente, la lesión A/E incluye el borrado de las vellosidades intestinales y la formación de una estructura como pedestal, rica en actina sobre la cual se adhieren las bacterias EPEC (Figura 1).

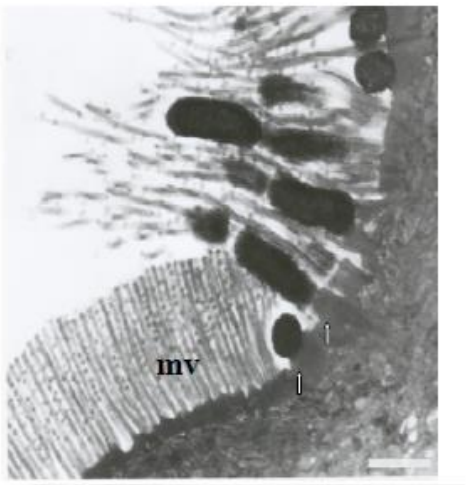


Figura 1: Lesión A/E en ileo de conejo infectado con aEPEC mostrando el alargamiento de las microvellosidades y la formación de pedestales (Bar 26 µm).

1.1.3.- Mecanismos y factores de virulencia involucrados en la interacción de EPEC con la célula huésped

A.- Adherencia

Las cepas tEPEC producen el llamado patrón de adherencia localizada (LA) sobre la superficie de las células HeLa/HEp-2 [Scaletsky et al., 1984], con formación de microcolonias compactas en la superficie celular mediada por el BFP [Giron 1991 et al]. La formación de microcolonias también se observa en la infección natural en niños, y en las biopsias *ex vivo* de humanos [Polotsky et al., 1977; Nougayrede et al., 2003]. Por el contrario, la mayoría de las cepas aEPEC producen un patrón modificado de LA denominado LAL (LA-like o simil LA) [Rodrigues et al., 1996], en el que se observa un número menor de bacterias sobre las células.

Mientras que el patrón LAL es característico de la mayoría de las cepas de los serotipos aEPEC [Abe et al., 2009; Viera et al., 2001], algunas cepas aEPEC expresan modelos alternativos de adherencia *in vitro*, como la adherencia difusa (DA) o la adherencia agregativa (AA) [Abe et al., 2009; Dulguer et al., 2003; Viera et al., 2001; Nunes et al., 2003].

A.1.- Adhesinas

El BFP, el primer factor de virulencia identificado en pEAF [Giron 1991 et al], está codificado por el operón BFP que consta de 14 genes [Stone et al.,1996; Sohel et al., 1996; Torres et al 2005] Los filamentos del BFP interconectan las bacterias EPEC dentro de las microcolonias para promover la adherencia no-íntima de EPEC a los enterocitos en el intestino delgado y también están involucrados en la dispersión de las bacterias a través de la mucosa intestinal [Clearly et al., 2004; Tobe et al., 2001].

El BFP probablemente interviene en la adherencia inicial, mediante la unión a la N-acetil-lactosamina o receptores similares en la superficie la célula huésped [Hyland et al., 2008]. La contribución de BFP a la virulencia de EPEC se ha establecido por estudios realizados en voluntarios que ingirieron cepas EPEC con mutaciones en los genes del operón BFP y que tenían diarrea menos severas que las personas que recibieron la cepa de tipo salvaje [Bieber et al., 1998].

A.2.- Intimina

La intimina es necesaria para la adherencia íntima de las bacterias a las células epiteliales y la reorganización del citoesqueleto [Jerse et al., 1990; Torres et al., 2005]. Se trata de una proteína de membrana externa de 94 kDa con una alta variabilidad en la composición de aminoácidos en su dominio C-terminal. El dominio altamente conservado N-terminal se inserta en la membrana externa de la bacteria, mientras que el dominio adhesivo C-terminal extracelular se expone al medio ambiente [Frankel et al., 1994]. Basándose en diferencias en la secuencia de nucleótidos de la porción C-terminal de la molécula, se han descripto más de 27 subtipos de intimina [Jores et al., 2001; Zhang et al., 2002]. Estos subtipos se nombran con letras griegas, siendo los tipos α y β los más comunes entre las tEPEC, mientras que los subtipos α, β, ζ, δ, y ε parecen ser las más frecuentes entre las cepas de los serotipos aEPEC. [Gomes et al., 2004; Blanco et al., 2006; Jenkins et al., 2006].

Por lo general, la mayoría de las cepas tEPEC de un serotipo determinado portan el mismo subtipo de intimina [Trabulsi et al., 2002], pero no todos los serotipos aEPEC tienen el mismo subtipo de intimina. La parte variable expuesta de la molécula de intimina se conecta a su proteína receptora Tir (receptor translocador de intimina), la cual es traslocada dentro del citosol de la célula eucariota blanco a través de un T3SS. Después de su translocación, el Tir es insertado en la membrana plasmática exponiendo su parte media en la superficie celular como un bucle. La intimina interactúa con esta región, induciendo el agrupamiento de moléculas Tir adyacentes, mientras que las porciones amino y carboxi del Tir son expuestas al citosol [Kenny et al., 1997].

El dominio C-terminal del Tir es fosforilado en su residuo Y474 y provoca la polimerización de actina en las cepas de tEPEC mientras que el Tir de las cepas de EHEC no es fosforilado y emplea otras proteínas

efectoras para la misma función. Algunos estudios *in vitro* sugieren que diferentes subtipos de intimina puede determinar tropismo por diferentes sitios intestinales [Phillips et al., 2000]. Por lo tanto, los subtipos intimina pueden dar información importante sobre el tropismo tisular.

A.3.- EFA / LIF

El factor inhibitorio de linfocitos (LiFa) es una proteína de superficie descripta en cepas de tEPEC, que inhibe la proliferación de linfocitos y la síntesis de citoquinas pro-inflamatorias [Klapproth et al., 2000]. El factor Efa1 (factor de adherencia 1 de EHEC) fue descripto por primera vez como posible adhesina en algunas cepas de EHEC [Nicholls et al., 2000]. Los genes *lifA* y *efa1* son casi idénticos [Nicholls et al., 2000]. y se encuentran en una isla de patogenicidad denominada isla O 122 (OI-122). Efa1/LifA parecen contribuir a la adherencia de las cepas EPEC a las células epiteliales en ausencia de BFP. Hay evidencias que indican que *efa1/lifA* codifican un producto que regula la colonización bacteriana, la proliferación de células de las criptas intestinales, y la regeneración de las células epiteliales durante la colonización *in vivo* [Klapproth et al., 2005].

A.4.- Otras adhesinas

La secuencia completa del genoma de la cepa prototipo tEPEC E2348/69, publicada recientemente, reveló la presencia de ocho operones intactos y cinco operones fimbriales incompletos, así como regiones de codificación diez adhesinas putativas nonfimbriales [Iguchi et al., 2009]. Sin embargo, entre los productos identificados del operón intacto, hasta ahora sólo se confirmó que BFP desempeña un papel en la formación de microcolonias *in vitro* [Giron et al., 1991] y la producción de diarrea en voluntarios humanos [Bieber et al., 1998]. Otras fimbrias codificadas por la cepa tEPEC E2348/69 incluyen las fimbrias tipo 1, fimbrias homólogas de las fimbrias polares largas (LPF, del inglés, *long polar fimbriae*) [Tatsuno et al., 2006]. Las LPF se identificaron originalmente en *Salmonella enterica* serovar Typhimurium y demostraron regular la adherencia de este organismo a las Placas de Peyer en el modelo murino *in vivo* [Baumler et al., 1996]. Estas fimbrias también median en la formación de microcolonias que contribuyen a la colonización por EHEC O157:H7 en algunos modelos animales [Jordan et al., 2004]. Estudios iniciales han indicado que el LPF no sería necesario para la adherencia y la formación de la lesión A/E [Tatsuno et al., 2006]. En cepas aEPEC y tEPEC, se encontraron diferentes variantes *lpfA*. Recientemente, se demostró que el pili común de *E. coli* (ECP, del inglés *E. coli common pilus*), que está presente en la mayoría de los aislamientos de *E. coli*, puede actuar en forma conjunta con BFP para estabilizar las interacciones entre EPEC y las células del hospedador [Rendon et al., 2007]. Además, se ha propuesto que el filamento EspA del T3SS es la adhesina mediadora de la adherencia inicial de

las cepas EPEC que carecen de BFP [Clearly et al., 2004], pero la adherencia inicial de las cepas aEPEC probablemente pueda ser multifactorial.

A.5.- Flagelos

Los flagelos contribuyen a la virulencia de las bacterias patógenas a través de la motilidad, la quimiotaxis, y la estimulación de IL-8 en células eucariotas. Además, algunas especies de flagelos, mostraron promover la adherencia y la invasión de las superficies celulares [Ramos et al., 2004]. Algunos tipos de antígenos flagelares, como el H2 y el H6 han sido identificados de forma consistente entre las cepas EPEC aisladas en diversos estudios epidemiológicos en todo el mundo.

B.- Eventos de señalización

B.1.- Sistema de Secreción Tipo Tres (T3SS)

La virulencia de EPEC y la producción de la lesión A/E son conferidos por la isla de patogenicidad cromosómica LEE, que codifica para el T3SS [Jarvis et al., 1995; Elliott et al., 1998]. Los T3SSs son utilizados por muchas bacterias patógenas gram-negativas para secretar proteínas efectoras directamente en las células eucariotas, alterando los diferentes procesos celulares del hospedador [Hueck et al., 1998; Cornelis et al., 2006]. T3SS constituye una estructura macromolecular compleja de más de 20 proteínas diferentes que atraviesa la envoltura celular bacteriana [Cornelis et al., 2006; Galán et al., 2006]. Se compone de una base en forma de anillo que abarca ambas membranas, y se extiende una proyección en forma de aguja que sobresale de la superficie bacteriana [Sekiya et al., 2001; Blocker et al., 2001]. Además, una proteína hidrófila forma un complejo de punta en el extremo distal de la aguja, y sirve como una plataforma para el montaje de dos proteínas hidrofóbicas, translocatoras para la formación de poros en la membrana de la célula huésped [Mueller et al., 2008; Mueller et al., 2005]. Los efectores son transportados a través de la aguja hueca directamente al citoplasma de las células diana a través del poro de translocación [Blocker et al., 2001; Mueller et al., 2008].

B.2.- LEE y efectores codificados no-LEE

El análisis de la secuencia del genoma de la cepa prototipo E2348/69 reveló la existencia de 21 genes efectores del T3SS llevados como profagos lambda e integrones [Iguchi et al., 2009]. Siete de los efectores traslocados a través del T3SS están codificados dentro del PAI LEE (Tir, Map, EspB, EspF, EspH, EspZ y

EspG), mientras que los demás se encuentran dispersos a lo largo del cromosoma y se denominan efectores codificados no-LEE- (NLE) [Deng et al., 2004; Dean et al., 2009]. Los efectores translocados LEE modifican las funciones normales de la célula huésped y son responsables de la formación de la lesión A/E, con la excepción de EspZ [Kanack et al., 2005]. El primer efector LEE que se caracterizó fue Tir, siendo esencial para la formación del pedestal [Kenny et al., 1997]. Además de promover la adherencia íntima, la polimerización de actina y el reordenamiento del citoesqueleto, la interacción Tir-intimina también provoca la fosforilación de una fosfolipasa de la célula hospedadora [Kenny et al., 2002] y facilita la invasión de células no fagocíticas [Jepson et al., 2003]. Muchos de los efectores EPEC traslocados tienen múltiples funciones y capacidad de cooperar entre sí [Garmendia et al., 2005; Dean et al., 2005]. Map (Proteína asociada mitocondria) afecta a la estructura y función de las mitocondrias [Kenny et al., 2000], induce la formación de filopodios [Kenny et al., 2002], y es esencial para la disrupción de la barrera intestinal y la alteración de la estructura de unión entre células (TJ) [Dean et al., 2004]. EspF, otro efector multifuncional que también es dirigido a las mitocondrias para iniciar el proceso de muerte mitocondrial [Nougayrede et al., 2004], tiene un papel en la disrupción de la barrera intestinal [McNamara et al., 2001], la remodelación del borde en cepillo de las microvellosidades [Shaw et al., 2005], y la redistribución de las proteínas TJ [Paralta-Ramirez et al., 2008]. Además, EspF ha sido implicado en la muerte celular por apoptosis [Crane et al., 2001] y en la inhibición de la fagocitosis [Quitard et al., 2006]. EspG y su homólogo EspG2 Nle mostraron desencadenar la formación de la tensión de las fibras de actina y la destrucción de la red de microtúbulos por debajo de las bacterias adheridas [Shaw et al., 2005; Matsuzawa et al., 2004]. Más recientemente, se demostró que tanto EspG y EspG2, juegan un papel en la inhibición del transporte intestinal de cloruro en la membrana intestinal [Gill et al., 2007], y que activan la cisteína proteasa calpaína de la célula huésped durante la infección por EPEC, y que conducen a la necrosis célular [Dean et al., 2010]. El efector EspH se localiza en la membrana de la célula huésped y modula la estructura del citoesqueleto de actina [Tu et al., 2003]. EspH, Tir, y Map colaboran para organizar el montaje y desmontaje de los filopodios y pedestales de actina [Kenny et al., 2002]. EspB, es una proteína translocatora esencial para la distribución de los efectores, actúa como un modulador del citoesqueleto de la célula huésped [Tylor et al., 1998]. También participa en el borramiento de las microvellosidades y en la prevención de fagocitosis [Lizumi et al., 2007]. Los efectores no-LEE también tienen un papel en la virulencia de EPEC, aunque se conoce relativamente poco acerca de su función celular [Croxen et al., 2010]. Dado que las principales propiedades de virulencia de EPEC se han atribuido a los efectores de LEE, se propone que los efectores no-LEE actúan como factores accesorios para una infección eficiente [Dean et al., 2009]. En contraste con los efectores LEE que se conservan entre todos los agentes patógenos A/E, existe una variación considerable de proteínas efectoras entre las cepas no-LEE [Iguchi et al., 2009].

B.3.- Autotransportadores

Las cepas EPEC también codifican las proteínas asociadas a la virulencia que son secretadas a través de un mecanismo de secreción de tipo V [Yen et al., 2008]. EspC es la proteína autotransportadora más estudiada en este patógeno. Cuenta con una proteasa de serina conservada similar a la de la proteasa de IgA y se ha demostrado que posee actividad enterotóxica [Mellies et al., 2001; Stein et al., 1996]. Recientemente, se ha demostrado que la internalización de EspC en la célula huésped también depende de T3SS, lo que sugiere la cooperación entre los dos sistemas de secreción [Vidal et al., 2008].

B.4.-Regulación

La región LEE contiene 41 genes organizados en cinco grandes operones policistrónicos (LEE1 a LEE5) y numerosas unidades de transcripción menores que son reguladas positivamente por Ler, un regulador clave de la transcripción de la virulencia de EPEC codificado por el primer gen del operón LEE1 [Mellies et al., 2007171]. Ler regula la expresión génica por LEE al contrarrestar la represión impuesta por el regulador H-NS [Bustamante et al., 2001]. Por otra parte, en las cepas tEPEC, el plásmido EAF codifica un regulador PerC que también juega un papel en la regulación positiva de *ler*, vinculando la expresión de BFP con la expresión de LEE [Bustamante et al., 2001; Porte et al., 2004; Gomez-Eduardo et al., 1995]. Además, en EPEC y EHEC, Ler también regula factores, de virulencia codificados no-LEE por ejemplo, *espC*, *nleA* y *lpf*, por lo que se considera un regulador global de la virulencia de EPEC [Elliot et al 2000; Roe et al., 2007].

.

C.- Invasión

Algunos estudios *in vivo* han demostrado la presencia de EPEC dentro de los enterocitos humanos [Polotsky et al., 1977, Pedroso 1993, Ulshen et al., 1980] y diferentes líneas celulares *in vitro* [Miliotis et al., 1989; Andrade et al., 1989]. Sin embargo a pesar de estas evidencias, la invasión no ha sido considerada como una característica patogénica de las cepas tEPEC *in vivo*, y las cepas de este patotipo han sido consideradas patógenos extracelulares [Nataro et al., 1998].

1.1. 4- Diversidad de las propiedades de virulencia

Las cepas tEPEC son en general más homogéneas en sus características de virulencia, expresadas en los genes de virulencia de LEE y del plásmido EAF [Trabulsi et al., 2002]. Por el contrario, además de los genes

codificados en LEE, muchas cepas aEPEC son portadoras de genes que codifican para factores de virulencia de otros patotipos de *E. coli* (incluso de *E. coli* patógenas extra-intestinales) en diferentes combinaciones [Trabulsi et al., 2002; Abe et al., 2009; Gomes et al., 2004; Vieira et al., 2001], lo que refleja la heterogeneidad del grupo. Sin embargo, el papel de estos genes o combinaciones de genes diferentes en la patogénesis de aEPEC es desconocida. También se conoce que algunas cepas de tEPEC y EHEC pueden perder el pEAF o los fagos codificadores de *stx* durante la infección, respectivamente, generando cepas de *E. coli* desprovistas de estos genes, que serían diagnosticadas como cepas aEPEC [Levine et al., 1985; Bielaszewska et al., 2008].

1.1.5.- Reservorio y transmisión

Hasta ahora, los estudios han demostrado que tEPEC rara vez se detectan en los animales y sus reservorios comprenden sólo los seres humanos [Trabulsi et al., 2002]. Muchos niños adquieren la infección en los hospitales públicos, generalmente por el contacto con otros pacientes hospitalizados con diarrea. Aunque no está completamente caracterizado, es evidente que tEPEC pueden ser transmitidas por la ingestión de alimentos y agua contaminados [Blake et al., 1993]. La sustitución de la lactancia materna por la alimentación con mamadera aumenta el riesgo de contraer diarrea [Blake et al., 1993]. En contraste, varios informes han descrito el aislamiento de cepas aEPEC de diferentes especies animales con o sin diarrea, como vacas, ovejas, cabras, cerdos y aves de corral, como así también en animales domésticos, venados y monos Tití [Hernandes et al., 2009]. Aunque no hay evidencia de transmisión directa de los animales a los humanos, algunas cepas aEPEC aisladas de animales pertenecen a los serogrupos implicados en enfermedades humanas como por ejemplo: O26, O103, O119, O128 y O142 [Hernandes et al., 2009]. Esto sugiere que estos animales podrían constituir un reservorio importante de aEPEC a partir de los cuales estas cepas podrían transmitirse a los seres humanos.

1.1.6.- Aspectos clínicos

La diarrea por EPEC varía desde una infección subclínica a una infección fatal, probablemente en función de factores del huésped [Nataro et al, 1998]. Varios estudios han demostrado que las cepas tEPEC pueden inducir abundante diarrea secretora con moco pero sin sangre, con pérdidas importantes en las heces de líquidos y electrolitos. Se observan también vómitos y fiebre leve. Además, la infección por EPEC puede conducir a una severa mala absorción de nutrientes e incluso evolucionar a una intolerancia a los alimentos dando lugar al agravamiento de la desnutrición y la persistencia de la diarrea [Fagundes-Neto et al., 2000]. La dosis infectiva de EPEC necesaria para causar la enfermedad en los niños no ha sido establecida. Estudios en voluntarios indican que una alta dosis infectiva es necesaria para inducir diarrea (10^9 y 10^{10} bacterias), pero en

los niños se presume que es mucho más baja [Nataro et al., 1998]. Voluntarios adultos que ingirieron grandes cantidades (10^9 a 10^{10}) de EPEC presentaron períodos cortos de incubación (12 a 24 h) para desarrollar diarrea [Levine et al., 1978; Levin et al., 1985; Ferguson et al., 1952; June et al., 1953], pero el período de incubación en lactantes es desconocido [Thoren et al., 1983; Levine et al., 1984]. El examen de biopsias intestinales de niños infectados ha demostrado que EPEC se adhiere a la mucosa del intestino delgado y grueso [Tylor et al., 1986; Clausen et al., 1982]. La presencia de la lesión A/E parece estar asociada con la secreción de fluidos, y el desarreglo del sistema de enzimas digestivas de absorción, lo que conduce a la mala absorción de nutrientes. El edema, la infiltración de neutrófilos, y la reducción de la actividad enzimática en la mucosa intestinal han sido observados después de la infección por EPEC [Ulshen et al., 1980; Tylor et al., 1986; Boedeker et al., 1988].

1.1.7.- Respuesta inmune

Se ha demostrado respuesta de anticuerpos contra el antígeno O de algunos serogrupos en voluntarios convalecientes de una infección experimental por EPEC y en niños mayores de 1 año de edad [Neter et al., 1955; Levine et al., 1985; Donnenberg et al., 1993]. Además, la mayoría de los factores de virulencia de EPEC, como las principales adhesinas (intimina, y BFP) y la proteínas de señalización celular, (EspA, EspB y Tir), mostraron inducir respuesta inmune en el suero (IgG e IgM), leche, calostro y saliva (IgAs) en humanos sanos y enfermos y en el calostro de bovinos [Silva et al., 1992; Palmeira et al., 2009]. En la leche materna, la IgA y otros factores mostraron contribuir a la inmunidad mediante el bloqueo de la adherencia bacteriana [Cravioto et al., 1991]. Una fuerte respuesta de anticuerpos en suero y saliva de los niños reactivos a factores de virulencia de EPEC fue desarrollada tempranamente presentando un repertorio de anticuerpos equivalente a la de un adulto en la misma zona geográfica [Carbonare et al., 2003]. En conjunto, estos hallazgos sugieren que la reducción en la frecuencia de tEPEC en niños mayores de 2 años de edad puede ser, por lo menos en parte, debido al desarrollo de anticuerpos anti-EPEC.

1.1.8.- Diagnóstico

En la actualidad, los ensayos moleculares son los métodos más apropiados para la identificación de EPEC. Estos métodos incluyen PCR y PCR múltiple, así como sondas genéticas para detectar pEAF (sonda EAF) [Nataro et al., 1985], *bfpA* (que codifica para la subunidad mayor de BFP), genes *eae* (u otros genes de LEE) y genes *stx* (que codifican para las toxinas Shiga) [Giron et al., 1993; Jerse et al., 1990; Muller et al., 2007; Aranda et al., 2007]. Las cepas EPEC han sido identificados por la presencia de la región LEE y la ausencia de los genes *stx*, la falta de *stx* distingue EPEC de STEC. Las cepas de tEPEC y aEPEC se diferencian

principalmente por la presencia de la secuencia EAF y/o del gen *bfpA* en el primer grupo. A pesar de que todas las cepas de tEPEC llevan *bfpA*, algunas cepas aEPEC contienen un operón BFP defectuoso lo que resulta en reacciones positivas para este gen. Por esta razón, para diferenciar cepas atípicas de EPEC típicas, se recomienda la búsqueda de la expresión de BFP por métodos inmunológicos [Trabulsi et al., 2002; Abe et al., 2009; Nara et al., 2010]. Como las cepas aEPEC son muy heterogéneas y se pueden aislar con frecuencia en niños sin diarrea, es importante demostrar su capacidad potencial para promover lesiones A/E en las células epiteliales. Esto podría lograrse *in vitro* mediante la tinción fluorescente de actina descripta por Knutton et al. [Knutton et al., 1989]. Sin embargo, el uso de métodos para identificar la expresión BFP y la capacidad para promover lesiones A/E está hasta el momento limitado a los laboratorios de investigación.

1.1.9.- Tratamiento y profilaxis

La terapia de rehidratación oral reduce notablemente la mortalidad temprana y es el tratamiento más eficaz contra las infecciones leves por EPEC. Sin embargo, se ha demostrado que los niños con infección por EPEC que no pueden responder a esta medida terapéutica, y que además presentan intolerancia a la leche de vaca, requieren hospitalización y desarrollan diarrea persistente [Fagundes-Neto et al., 2000]. Esto es probablemente debido a los daños causados en la mucosa intestinal, la cual puede requerir tiempo para recuperar plenamente sus funciones (digestión, absorción, y defensa) [Nataro et al., 1998]. La terapia con antibióticos sólo se recomienda para los casos más graves o en casos de diarrea persistente asociada con aEPEC [Ochoa et al., 2008; Senerwa et al., 1991]. Sin embargo, los patrones de susceptibilidad antimicrobiana de tEPEC y aEPEC varían entre las diferentes áreas geográficas estudiadas y la resistencia a los antibióticos son comunes en muchas áreas del mundo [Abe et al., 2009; Thoren et al., 1983; Senerwa et al., 1991; Gross et al., 1985]. En consecuencia, las pruebas de sensibilidad se deben realizar antes del establecimiento de la terapia.

Como se mencionó la leche materna puede contener anticuerpos contra los antígenos O de EPEC y proteínas de membrana externa, los cuales inhibirían la adherencia de EPEC a las células de cultivo de tejidos. La lactancia materna tiene un efecto protector probablemente debido al efecto cooperativo de la IgA con la presencia de oligosacáridos [Cravioto et al., 1991], o por un efecto inhibidor directo de la lactoferrina [Boesman-Finkelstein et al., 1985]. Además de la lactancia materna, las medidas apropiadas de higiene y alimentación podrían prevenir la infección de los niños en los países en desarrollo [Sobel et al., 2004]. Las inmunización contra EPEC podrían ser otra probable estrategia de prevención, sin embargo actualme no hay disponible una vacuna con licencia para los seres humanos contra las infecciones por EPEC [Horne et al., 2002].

1.1.10.- Epidemiología e impacto en América Latina

Durante muchas décadas, estudios realizados en todo el mundo han demostrado que los serotipos tEPEC están fuertemente asociados con diarrea en niños <1 año de edad, principalmente en niños pobres de los centros urbanos en los primeros seis meses de vida [Nataro et al., 1998]. En este grupo de edad, estos serotipos se consideran la principal causa de diarrea endémica en países en desarrollo, incluyendo América Latina [Toledo et al., 1983; Cravioto et al., 1988]. La frecuencia de los serotipos de tEPEC en niños mayores de un año de edad disminuye con la edad y los adultos rara vez adquieren infecciones por EPEC, salvo en condiciones excepcionales [Nataro et al., 1998]. El aumento de la resistencia en niños mayores y adultos se atribuye al desarrollo de inmunidad o a la pérdida de receptores específicos para algunas adhesinas [Nataro et al., 1998]. Desde la década de 1960, en los países desarrollados se produjo una importante disminución en la frecuencia de tEPEC y desde entonces estas bacterias se han detectado en raras ocasiones. Sin embargo en estos países las aEPEC se encuentran con frecuencia en pacientes con diarrea [Robins-Browne 1987; Nataro et al., 1998; Afset et al., 2004; Cohen et al., 2005]. En los últimos años, en algunos países en desarrollo también se ha detectado una disminución en la frecuencia de las cepas de tEPEC [Trabulsi et al., 2002; Regua-Mangia et al., 2004; Araujo et al., 2007]. Las probables razones de esta disminución incluyen, un mejor control de las infecciones hospitalarias, mejores tratamientos, medidas de saneamiento y nutrición de los niños [Trabulsi et al., 2002].

La epidemiología de las cepas aEPEC ha sido analizada recientemente en todo el mundo [Hernandes et al., 2009; Ochoa et al., 2008]. Es de destacar que este patotipo ha demostrado un papel más importante en la diarrea en los países en desarrollo [Franzolin et al., 2005; Bueris et al., 2007; Estrada-García et al., 2005]. En muchos de estos estudios la frecuencia de cepas aEPECes similar en individuos con y sin diarrea. Por lo tanto, una fuerte asociación de los serotipos aEPEC con diarrea endémica aún no se ha demostrado. Aún así, las cepas aEPEC han sido encontradas en pacientes con diarrea de distintas edades y en pacientes adultos con VIH-SIDA [Gomes et al., 2004]. Por otra parte, algunos serotipos han sido incriminados como agentes en brotes de diarrea, pero hasta ahora no han sido reportados brotes en América Latina debido a aEPEC.

1.2- *Escherichia coli* enterotoxigénico (ETEC)

En 1971, esta categoría fue asociada por primera vez a casos de diarrea en adultos [Sack et al., 1971]. Estudios posteriores en voluntarios humanos permitieron establecer que una dosis de 10^8 a 10^{10} unidades formadoras de colonias era necesaria para causar diarrea [Tacket at al., 2004].

Las cepas ETEC afecta a los adultos de los países desarrollados que viajan a países en desarrollo y sigue siendo la principal causa bacteriana de la diarrea del viajero [Mohamed et al., 2007]. ETEC se detecta con mayor frecuencia entre los viajeros que visitan América Latina y el Caribe en comparación con aquellos que estuvieron en África o Asia. En general, ETEC se identifica en el 30,4% de los casos de diarrea del viajero. Con estadías prolongadas, la colonización y la diarrea asociada a ETEC disminuye, y las tasas en viajeros se asemejan a las tasas de colonización e infección por ETEC observadas en los habitantes de las zonas endémicas. Sin embargo, la inmunidad en viajeros que visitan países en desarrollo es de corta duración cuando las exposiciones no son repetidas.

En los países en desarrollo, ETEC es el patógeno bacteriano más común identificado en niños menores de 5 años con diarrea aguda. Se estima que anualmente es responsable de 200 millones de casos de diarrea en todo el mundo con aproximadamente 150.000 muertes [Wenneras et al., 2004]. ETEC puede causar infecciones recurrentes en niños, en particular en menores de 24 meses. Los niños mayores y los adultos son menos susceptibles, pero también pueden experimentar diarrea con deshidratación.

1.2.1- Serotipos

Los aislamientos de ETEC expresan una gran variedad de antígenos somático "O" y flagelar "H". En un trabajo realizado por Wolf et al. (1997), se investigó la frecuencia de distribución de los antígenos somático"O", flagelar "H", los factores de colonización (CFA) y las toxinas LT y ST en 954 cepas de ETEC aisladas en diferentes regiones del mundo. Al analizar individualmente los serogrupos se observó que O6, O8, O78, O128 y O153 se detectaban en más del 50% de los aislamientos. Mientras que al analizar conjuntamente con los datos de "H", "CFA" y toxinas, el perfil O6:H16 CFA/II LTST fue el más frecuente (11%) seguido por los perfiles O153:H45 CFA/I ST, O78:H12 CFA/I ST, O148:H28 CFA/IV ST, O8:H9 CFA/II LTST, O27:H7 CFA/IV ST, y O169:H2CFA/IV ST detectados en un 24% del total de los aislamientos.

En otro estudio realizado en Japón (Yuichiro et al., 2004), 79 cepas de un total de 1130 aislamientos fueron ETEC por identificación molecular de los factores de virulencia y los serogrupos O126 (%), O27 (%) y O169 (%) fueron los más frecuentemente detectados.

1.2.2.- Patogenia

Las cepas ETEC antes de producir diarrea deben adherirse a las células epiteliales que recubren la mucosa del intestino delgado a través de una interacción mediada por adhesinas proteicas de superficie, también conocidas como factores de colonización (CFs). Estos factores se clasifican según su especificidad antigénica en factores antigénicos de colonización (CFA), antígeno de superficie de *coli* (CS) y probable factor de colonización (PCF). Luego de la colonización, ETEC se caracteriza por la capacidad de producir una y/o dos enterotoxinas conocidas como LT (termolábil) y ST (termoestable).

1.2.3.- Mecanismos y factores de virulencia involucrados en la interacción de ETEC con la célula huésped

A.- Adherencia

Los CFs que intervienen en la adherencia y en la colonización del intestino delgado pueden tener una estructura fimbrial, no-fimbrial, helicoidal, o fibrilar. Se han identificado más de 25 factores diferentes, los cuales se clasifican según su antigenicidad, peso molecular, secuencia de aminoácidos de la región N-terminal, y también de acuerdo a la morfología estructural.

El CFA/I, CFA/II (compuesto por CS1, CS2 y CS3 en diferentes combinaciones), CFA/III, y CFA/IV (compuesto por CS4, CS5 y CS6), CS7, CS17, CS19, CS20, CS22 y los PCFO9, PCFO20, PCFO148, PCFO159 y PCFO166 constituyen los CFs más frecuentes expresados por cepas ETEC que infectan al humano [Turner et al., 2006]. Sin embargo, la distribución de los CF entre las cepas de ETEC varía geográficamente y en el tiempo. A modo de ejemplo, mientras CFA /I es el fenotipo más comúnmente identificado en Chile [Vidal et al., 2009], CFA/II y CFA/IV son los más comúnmente identificados en Egipto [Rockabrand et al., 2006]. Cada factor de colonización esta constituido por una subunidad proteica codificada en un plásmido de alto peso molecular. En diferentes trabajos se ha observado que la mayoría de los factores están asociados con un número limitado de serotipos y tipos de toxina. La interacción entre los CFs y los receptores de tipo oligosacáridos presentes en la superficie de la célula epitelial, es huésped específica. Por lo tanto los CFs que expresan las cepas ETEC que causan infección en humanos son diferentes a los expresados por aquellas cepas que infectan animales. Los CF de origen animal se los conoce como K o F o P. Los CFs más comunes en animales son F4, F5 y F6, también conocidos como fimbrias K88, K99, y 987P, respectivamente.

B.- Toxinas

B.1.-Toxina termolábil (LT)

La enterotoxina termolábil (LT) induce diarrea secretora y respuesta inmunológica con anticuerpos neutralizantes. Es además un importante adyuvante inmunológico ya que posee un peso molecular de 86 kDa. LT está estrechamente relacionada con la toxina del *Vibrio cólera* ya que comparte con esta, una homología de 82% en la secuencia de aminoácidos. La toxina es una holotoxina pentamérica compuesta por 5 subunidades B de 11,5 kDa cada una y una subunidad A de 28 KDa. Las 5 subunidades forman un anillo que se une específicamente a un receptor de tipo gangliósido (GM1 y GD1b) presente en la superficie del epitelio intestinal. Después de la unión, la toxina endocitada llega a través del mecanismo de transporte retrógrado del aparato de Golgi a la membrana basal de la célula. La subunidad A (péptido A1) se libera en el citosol y en virtud de su actividad de ribosilación activa a la enzima adenilatociclasa (ADP). La enzima activada eleva el nivel de AMP cíclico intracelular [Gill et al., 1980] por lo cual se aumenta la actividad de una kinasa que fosforila los canales de cloruro de la membrana apical. El resultado final es la estimulación de la secreción de iones cloruro y la inhibición de la absorción de ClNa. Este incremento de iones hace que por osmosis aumente el contenido acuoso en el lumen intestinal provocando la diarrea.

La toxina LT se puede clasificar en dos grandes tipos conocidos como LT-I y LT-II. Ambos difieren en la afinidad por el hospedador y también en sus secuencias genéticas. LT-I es expresada en cepas que son patógenas tanto para humanos como para animales y pueden ser sub-clasificadas en LTH (derivadas de los seres humanos) y LTP (derivadas del cerdo). Recientemente se ha reconocido que las cepas LT-I son genéticamente diversas, con más de 16subtipos distintos descriptos hasta la fecha [Lasaro et al., 2008]. LT-II es reconocida principalmente en cepas aisladas de animales y raramente en aquellas que infectan al humano. En todo el mundo, se estima que el 66% de todas las cepas identificadas como ETEC producen solo LT o en combinación con ST.

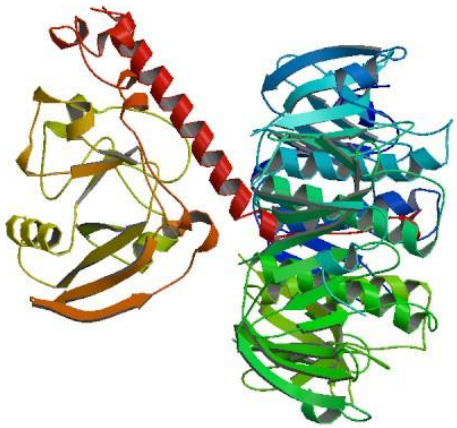


Figura 1. Estructura de la toxina lábil al calor

B.2.-Toxina termoestable (ST)

La enterotoxina termoestable (ST) también produce diarrea. Es un péptido de 18-19 aminoácidos con un peso molecular de 2 kDa. Hay distintos tipos de toxinas ST que se clasifican en dos tipos principales: STa que se identifica sobre todo en heces humanas, y STb que se identifica en las heces de los animales. Diversas bacterias entéricas han demostrado la elaboración de ST idénticas o altamente homólogas, como *Yersinia enterocolitica, Citrobacter freundii*, y *Klebsiella pneumoniae* [Giannella et al., 1995]. Sin embargo, la importancia clínica de ST en otras enterobacterias sigue siendo desconocida. Una vez liberada en el lumen del intestino delgado, ST se une de forma reversible al dominio extracelular de la guanilato ciclasa (GC-C) presente en las células epiteliales de las vellosidades y criptas. Esta interacción activa el dominio catalítico intracelular de GC-C que conduce a la acumulación intracelular de cGMP [Guandalini et al., 1982; Schulz et al., 1990]. Al igual que el efecto resultante por la acción de LT, el aumento de cGMP altera el transporte de membrana, mediante la activación de proteínas kinasas específicas, que producen la fosforilación, ya sea de los canales de iones o de las proteínas reguladoras asociadas. Esto conduce a la alteración del flujo bidireccional de agua y electrolitos a través de la membrana apical de la célula epitelial provocando diarrea acuosa.

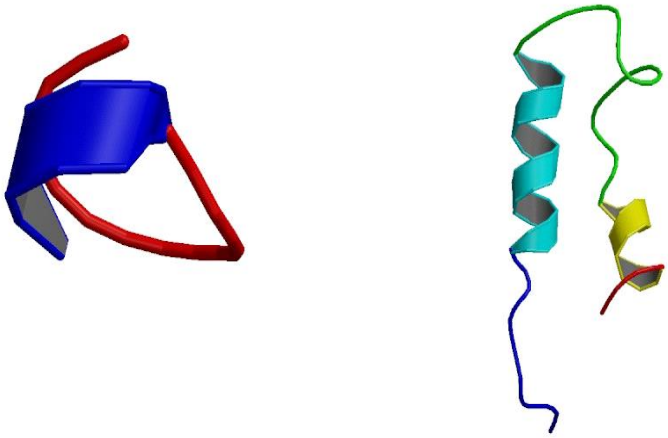


Figura 2. Estructura de la toxina estable al calor

C.- Serina Proteasa Autotransportadora

Además de las enterotoxinas LT y ST, se han descripto otras probables toxinas, como la serina proteasa autotransportadora **(**EatA) que actúa como una proteasa extracelular. Posee especificidad y actúa escindiendo oligopéptidos p-nitroanilideconjugados. Estos oligopéptidos escindidos son sustratos de la catepsina G, que a su vez modula y se une a una amplia gama de otros productos extracelulares, incluyendo proteoglicanos y a la superficie celular dañando la superficie de las células epiteliales [Patel et al., 2004].

1.2.4.- Reservorio y transmisión

Investigaciones epidemiológicas han demostrado la implicancia del agua y alimentos contaminados como vehículos de la infección por ETEC. Se ha detectado altos niveles de contaminación por ETEC en muestras de agua y de alimentos tomadas de áreas endémicas para esta infección. En países en desarrollo la contaminación fecal del agua y de los alimentos constituye la principal razón de la alta incidencia de diarrea por ETEC.

1.2.5.-Aspectos clínicos

Las características clínicas de la enfermedad por ETEC son consistentes con los mecanismos de patogenia descriptos. La diarrea se presenta en forma profusa con un corto período de incubación (14 a 50 horas)

de característica acuosa, sin sangre ni mucus. Fiebre y vómitos se presentan con muy baja frecuencia. La diarrea puede ser leve, breve y auto limitarse o puede resultar severa como la observada en las infecciones graves por *Vibrio cholerae.*

1.2.6.- Diagnóstico

La caracterización de los genes LT y ST se realiza mediante el uso de sondas moleculares específicas para estas toxinas. La mayoría de los laboratorios utilizan técnicas de hibridación de colonias o la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con oligonucleótidos específicos a partir de cultivos de materia fecal. También pueden utilizarse enzimoinmunoensayos (ELISA) para la detección de LT, ST, CFs, y anticuerpos anti-LT y anti-CFs.

1.2.7.- Tratamiento

A.- Infección pediátrica por ETEC

El tratamiento de la enfermedad diarreica por ETEC en edad pediátrica es el mismo que para otras enfermedades de diarrea aguda secretora. La corrección y el mantenimiento de la hidratación siempre es la intervención más importante. No se recomienda la terapia antimicrobiana en niños.

B.- Tratamiento de adultos con diarrea del viajero

Existen numerosos agentes antimicrobianos disponibles para el tratamiento de la diarrea del viajero. La elección de los antimicrobianos depende de la epidemiología de la región visitada, los patrones de resistencia microbiana, el perfil de seguridad a los antimicrobianos y las posibles interacciones esperadas. La rifaximina, fluoroquinolonas y azitromicina son los antimicrobianos que se utilizan con mayor frecuencia.

1.2.8.- Medidas preventivas

En general se recomienda que los viajeros mantengan las condiciones de higiene en los lugares de residencia, que no beban agua de grifo y que utilicen agua envasada. Lavar y cocinar bien los alimentos. Aunque no se recomienda de manera rutinaria, la profilaxis con antibióticos es muy eficaz en la prevención de la diarrea asociada a ETEC [DuPont et al., 2009]. Su utilización debe limitarse en los casos de viajeros con mayor riesgo de padecer la enfermedad o sus complicaciones.

Las infecciones recurrentes por ETEC en los niños de países en desarrollo inducen una inmunidad protectora, como se refleja en la disminución de las tasas de diarrea por ETEC con el aumento de la edad. Estos datos sugieren que la vacunación contra ETEC puede ser una estrategia efectiva de prevención, no sólo contra ETEC, sino también contra otros enteropatógenos. El desarrollo de vacunas contra ETEC se ha basado en la utilización de inmunógenos como los tres principales CFA (CFA / I, CFA / II, y CFA / IV), la toxina LT o el uso de células bacterianas enteras muertas que expresan CFA. A diferencia de las fimbrias o de LT, la toxina STa tiene un bajo poder inmunogénico. Sin embargo esa propiedad podría incrementarse utilizando un adyuvante o una proteína fuertemente inmunogénica como LT. La heterogeneidad geográfica y temporal de los factores de colonización y subtipos de de LT y ST, plantean importantes desafíos para el desarrollo de una vacuna efectiva para ETEC.

1.2.9.- Infecciones pediátricas por ETEC en América Latina

En la década de 1970, se identificó ETEC productor de LT en el 23% de niños mexicanos que presentaban diarrea aguda [Evans et al., 1977]. En un estudio prospectivo durante el periodo 1986-87, en niños que vivían en Guadalajara, México, se investigó la relación entre los patrones de alimentación infantil y las enfermedades diarreicas por ETEC productor de LT. En ese estudio, los niños alimentados estrictamente con fórmula láctea tuvieron una incidencia de diarrea tres veces mayor que los alimentados estrictamente con leche materna. Esto se debió a la inmunoglobulina A que el niño recibió a través de la leche materna [Long et al., 1999]. En otro estudio prospectivo llevado a cabo en las áreas peri-urbanas de Lima, Perú, mostró que si bien las cepas EPEC se detectaron con mayor frecuencia, sólo el 3% de los episodios de diarrea se debieron a ETEC [Ochoa et al., 2009].

1.3- *Escherichia coli* enteroinvasivo (EIEC)

Las cepas de *Escherichia coli* enteroinvasivo (EIEC) causan diarrea acuosa y disentería en el hombre. Esta categoría, por sus características bioquímicas, genéticas y de virulencia está muy relacionada con *Shigella* spp, por lo que todo el conocimiento de la patogenia de EIEC ha sido en su mayoría, obtenido de estudios sobre *Shigella* [Nataro et al., 1998, Puente et al., 2001]. Los miembros de esta categoría tienen la capacidad de invadir el epitelio del intestino grueso, multiplicándose en las células del enterocito, produciendo ulceración de la mucosa y muerte celular. Como consecuencia de la invasión celular, las cepas de EIEC provocan una respuesta inflamatoria importante asociada con destrucción de la mucosa intestinal. El extendido de materia fecal presenta abundantes leucocitos y a veces piocitos, característicos de una diarrea de tipo inflamatorio.

1.3.1-Serogrupos

En diferentes trabajos [Beutin et al., 1997; Cheasty et al., 1983] los serogrupos O28ac, O29, O112ac, O124, O135, O136, O143, O144, O152, O159, O164, y O167 fueron descriptos como los más frecuentes para EIEC. Según datos epidemiológicos de diferentes partes del mundo se observa que existe una asociación entre los serotipos y la región geográfica estudiada. En el área de Alemania [Beutin et al., 1997] considerada no endémica para la diarrea por EIEC, fueron detectados aislamientos de O124:H- y O124:H30 importados de paises de Europa oriental donde son prevalentes. En un estudio caso control realizado en Chile se detectaron cepas EIEC de 17 de 912 (1,9%) y de 3 de 1112 (0,3%) muestras de casos de niños con diarrea y de controles, respectivamente. Los serogrupos detectados fueron: O28ac, O124, O143 y O144 [Faundez et al., 1988]. En Argentina, en un trabajo que tenía como objetivo iidentificar y caracterizar 120 cepas de EIEC aisladas durante el período 1994–2003 se detectaron los serogrupos O28 (n=38), O124 (n=23), O143 (n=12), O136 (n=5), O112 (n=4), O18 (n=2), O29 (n=2), O44 (n=2) y O144 (n=2) [Chinen et al.,2007].

1.3.2.- Patogenia

Al igual que *Shigella* Spp., EIEC se caracteriza por la destrucción del epitelio colónico provocando una respuesta inflamatoria inducida por la invasión de la mucosa intesinal. La característica principal de EIEC y de *Shigella* es que presentan un plasmido Ipa cuyos genes están involucrados en la invasión al epitelio intestinal y en la capacidad de diseminarse de célula a célula. El modelo que describe la patogenia muestra que la bacteria atraviesa al epitelio invadiendo las células M e interactuando después con los macrofagos. La bacteria puede inducir la apotosis de éstas células evadiendo la vacuola fagocítica. De esta manera, puede acceder a la

superficie basolateral del epitelio e invadir al enterocito. Dentro de la célula epitelial, la bacteria puede lisar la vacuola endocítica y multiplicarse en el citoplasma. También puede inducir el reordenamiento del citoesqueleto y polimerización de la actina por la acción de una proteina de membrana externa, migrar y alcanzar la membrana de la célula vecina. La apoptosis en macrófagos genera la liberación de citoquinas como IL-1 e IL-8. Estas interleuquinas incrementan la reacción inflamatoria atrayendo a los monocitos al sitio de la infección. Estos al migrar a traves de la barrera epitelial, facilitarían aún más la invasión por EIEC [Parsot et al., 2005].

1.3.3.- Mecanismos y factores de virulencia involucrados en la interacción de EIEC con la célula huésped

A.- Antígenos de invasión codificados en plásmido Ipa

Los genes necesarios para la invasión están codificados en el locus *ial* en el plásmido Ipa (del inglés, invasión plasmid antigen) 140-MDa[Small et al., 1988]. El locus *ial* (del inglés invasión-associated locus) codifica las proteínas IpaB, IpaC, IpaD, IpaA y IpgC (que es una proteína chaperona de IpaB y el IpaC) [Menard et al., 1994]. Las proteínas efectoras son secretadas por el sistema MXI-Spa tipo III que también está codificado en el plásmido de invasión. IpaB, IpaC, y IpaD juegan un papel esencial en la entrada de la bacteria, mientras que IpaA está sólo parcialmente involucrado en la invasión [Menard et al., 1993; Tran Van Nhieu et al., 1997]. El complejo Ipa puede unirse a la integrina α5β1 [Watarai et al., 1996] y promover la invasión a las células epiteliales [Menard et al., 1996]. IpaB se une al receptor de hialuronato CD44, [Skoudy et al., 2000; 1999], y a la caspasa-1 [Hilbi et al., 1998]. El complejo IpaB-IpaC se inserta en las membranas de las células epiteliales, formando un poro que permite la translocación de proteínas efectoras, como IpaA. El proceso desencadena una serie de eventos de transducción en las células epiteliales [Sansonetti et al., 2000].

B.- IcsA y la propagación de célula a célula

Después de la invasión, EIEC rápidamente lisa la vacuola endocítica y se libera en el citosol. Rápidamente se recubre de actina filamentosa, dejando una cola de actina en un polo de la bacteria [Bernardini et al., 1989]. Estas prolongaciones de actina confieren a la bacteria la capacidad de moverse en el citosol de la célula huésped y dentro de la célula adyacente. Este mecanismo requiere de la expresión de la proteína IcsA/Virg [Makino et al., 1986]. IcsA es una proteína autotransportedora de 120 kDa, cuya carboxilo terminal forma un estructura de β cilindríca en la membrana externa, a través del cual el amino-terminal (dominio α) de la misma proteína (contiene el factor determinante para el montaje de actina) se transporta y se expone en la superficie bacteriana [Brandon et al., 2003; Goldberg et al., 1993]. IcsA recluta componentes citoplasmáticos de la célula

hospedadora para inducir la polimerización de actina, y su ubicación asimétrica asegura que el montaje de actina se produzca de una manera direccional [Egile et al., 1999, Goldberg et al., 1993]. La cantidad del dominio α de IcsA expuestos en la superficie bacteriana se relaciona con la eficiencia de la formación de la cola de actina [Magdalena et al., 2002].

C.- Factor hemoaglutinante manosa-resistente (HAF)

El factor hemoaglutinante manosa-resistente asociado a célula (HAF) fue identificado en la cepa EIEC del serotipo O124:H^- [Simi et al., 2002]. La proteína HAF es probablemente un factor no-fimbrial que podría mediar la adherencia de EIEC con las células epiteliales humanas. Sin embargo, aún no ha sido descripto información adicional acerca de la función que desempeñaría HAF en la adhesión de otros serotipos de EIEC.

1.3.4.- Aspectos clínicos y tratamiento

Clínicamente la diarrea por EIEC se presenta con elevada fiebre y disentería con sangre y pus. Por las características de las manifestaciones clínicas es frecuente el uso de antibióticos después de la determinación de la sensibilidad del agente.

1.3.5.- Diagnóstico

Como las cepas EIEC se caracterizan por tener propiedades bioquímicas muy similares a *Shigella*, (como la inactividad que se observa en algunas pruebas como la no fermentación de la lactosa, movilidad negativa y actividad decarboxilasa negativa), presentan dificultad para identificarlas y diferenciarlas a partir del cultivo de especímenes clínicos. Las posibles causas de esta dificultad residen, en la variabilidad y heterogeneidad [Silva et al., 1980] de las propiedades fenotípicas de estas cepas, en la falta de un método de rutina para su detección y en la necesidad de utilizar métodos moleculares además del seroagrupamiento, para poder definir a esta categoría. En años anteriores, diferentes trabajos [Toledo et al., 1983] recomendaban realizar el primo cultivo en agar MacConkey, identificar colonias no fermentadoras o lentas de la latosa, probar la actividad de lisina decarboxilasa y la movilidad, realizar el seroagrupamiento con antisueros polivalentes y monovalentes anti-O de los tipos más frecuentes de EIEC y por último aplicar el tes de Sereney [Sereney et al., 1957] con el cual se verificaba la propiedad de invasividad. En trabajos posteriores, se incorporaron técnicas como el ELISA [Pal et al., 1983] para detectar proteínas involucradas en el proceso de invasión, sondas genéticas o priemrs específicos para la detección del plásmido Ipa. En la actualidad se recomienda como técnica

de tamizaje la utilización de métodos moleculares como PCR con el objeto de amplificar un fragmento del locus *ial*, como así también un fragmento de IpaH. Las secuencias IpaH constituyen múltiples copias que se encuentran en el cromosoma bacteriano y en el plásmido Ipa. [Sethabutr et.al., 1992]. En el caso de obtenerse un resultado positivo por los métodos de amplificación, se deberá aislar la colonia positiva y aplicar un número mayor de pruebas bioquímicas para poder diferenciarla de *Shigella*.[Farmer et al., 1985; Ruiting Lan 2002, Chinen et al., 1993]. Aquellos laboratorios que no cuenten con la complejidad necesaria para realizar la técnica de PCR, deben utilizar las pruebas bioquímicas como tamizaje para seleccionar las colonias de *E. coli* presuntivas de EIEC pero además no omitir las pruebas diferenciales con *Shigella*.

1.3.6.- Epidemiología

En los estudios de brotes asociados a la infección por EIEC se observó que el patógeno suele ser transmitido por alimentos o agua contaminada, aunque la transmisión persona a persona también ha sido descripta [Harris et al., 1985]. La dosis infecciosa de EIEC detectada en voluntarios fue superior a la de *Shigella* spp. [Durno et al., 1989], así como el potencial de transmisión persona a persona fue menor. La enfermedad esporádica endémica se presenta en algunas áreas, por lo general donde *Shigella* spp. también es frecuente [Ketyi et al., 1989; Taylor et al., 1988]. Se ha descripto que estas áreas endémicas se caracterizan por tener condiciones sanitarias y de higiene deficientes. Esto podría explicar la baja incidencia que existe en los países desarrollados. De todas maneras se han descripto brotes ocasionales de origen alimentario, como por ejemplo uno ocurrido en un restaurante en la ciudad de Texas que involucró a 370 personas [Gordillo et al., 1992].

1.4- *Escherichia coli* Enteroagregativo (EAEC)

La patogénesis de *Escherichia coli* enteroagregativo (EAEC) está pobremente entendida en comparación con las otras cuatro categorías de *E.coli* diarreogénicos. Un rasgo común que define a las cepas EAEC es la capacidad de adherirse con una apariencia de "pared de ladrillos apilados" (Figura 1) en cultivos de células epiteliales HEp-2 [Nataro et al., 1998]. Este fenotipo deriva de la capacidad de EAEC para unirse a otras EAEC, a las células epiteliales, y a la superficie de las placas de cultivo de tejidos. A nivel molecular, los factores del fenotipo agregativo (también conocido como fenotipo AA) están contenidos en un plásmido de gran tamaño (pAA), que porta un número de genes de virulencia que están bajo el control del gen regulador *aggR*. Poco después de la descripción inicial de EAEC [Nataro et al., 1987] fue desarrollada una sonda génetica derivada del plásmido CVD432 o pAA [Baudry et al., 1990]. El estudio de las cepas EAEC experimentó un gran avance en 1994, cuando quedó demostrado en un estudio caso-control la capacidad de producir diarrea. La cepa prototipo EAEC 042, originalmente identificada en un niño con diarrea en el Perú, produjo diarrea en la mayoría de los voluntarios inoculados con 10^9 UFC. Esta cepa 042 (serotipo O44:H18), fue usada también como cepa prototipo para el estudio de factores de virulencia y patogenicidad [Nataro et al.,1995] y fue objeto de una reciente caracterización de su genoma [Chaudhuri et al.,7]. Las cepas EAEC, que hibridaron con la sonda AA fueron asociadas con persistencia de diarrea. Sin embargo, se observó que no todas las cepas EAEC que causan diarrea hibridan con los primers específicos para *aggr*. Esto llevó a clasificar en EAEC "típico" cuando *aggr* está presente y EAEC "atípico" cuando *aggr* está ausente [Harrington et al., 2006].

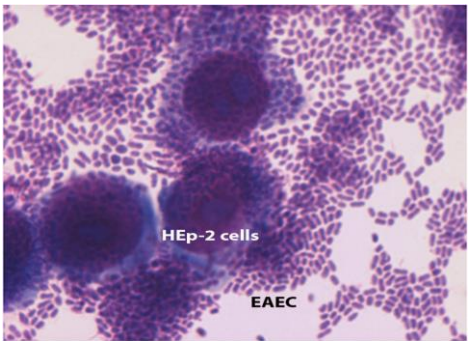


Figura 1: Patrón de adherencia de *E. coli* enteroagregativo (EAEC) a células HEp-2. EAEC se adhiere a células HEp-2 en un patrón conocido como auto-agregativo, en el que las bacterias se adhieren una a otra en configuración de una "pared de ladrillos apilados".

1.4.1- Serotipos

En esta categoría están descriptos una gran variedad de serotipos (O y H). [Vial et al., 1988; Yamamoto et al., 1992; Schmidt et al., 1995; Law et al., 1998]. Al menos 90 combinaciones O:H diferentes han sido identificadas. Algunos serogrupos como: O44, O86, O111, O126, y O128 también fueron descriptos para EPEC [Debroy et al., 1994a; Law et al., 1994; Schmidt et al., 1995). Mientras O44, O86 y O126 son predominantes en EAEC, otros, como O128 y O111, también se identificaron en aislamientos de EPEC, EHEC y ETEC [Scotland et al., 1993; Knutton et al., 1992]. Algunas capas resultaron ser no móviles o H no tipificables. [Vial et al., 1988; Yamamoto et al., 1992].

1.4.2- Patogenia

Una vez ingeridas, la localización de la infección en el tracto gastrointestinal no ha sido bien definida. La infección por EAEC ha sido asociada con una mayor producción de óxido nítrico y alteraciones de la permeabilidad de lactulosa [Kukuruzovic et al., 2002]. Los estudios realizados sobre muestras obtenidas por endoscópica intestinal muestran que EAEC se puede localizar en yeyuno, íleon, y al epitelio del colon [Nataro et al., 1996]. La afinidad por los diferentes segmentos del tracto intestinal es heterogénea entre las cepas EAEC estudiadas [Hicks et al., 1996]. A pesar que han sido descriptas una gran variedad de adhesinas, toxinas y proteínas implicadas en la patogénesis de EAEC, la prevalencia de los genes que codifican estos factores de virulencia es muy variable y ninguno de ellos han sido detectados en todas las cepas EAEC [Gioppo et al., 2000; Zamboni et al., 2004; Bouzari et al., 2005; Okeke et al., 2000]. Estos factores de virulencia pueden estar codificados en el plásmido pAA como en el cromosoma [Weintraub et al., 2007]. Se han sugerido tres características principales en la patogénesis de EAEC (i) adherencia a la mucosa intestinal, (ii) elaboración de enterotoxinas y citotoxinas, e (iii) inducción de la inflamación de la mucosa intestinal (Figura 2).

1.4.3.- Mecanismos y factores de virulencia involucrados en la interacción de EAEC con la célula huésped

A.- Adherencia

Numerosos autores han demostrado que el patrón AA se asocia con la presencia de adhesinas fimbriales y afimbriales en cepas EAEC. Sin embargo, los genes que codifican estas adhesinas se encuentran en baja prevalencia, lo que indica una alta diversidad de estructuras adhesivas responsables del patrón AA [Bernier et al., 2002; Boisen et al., 2008; Wai et al., 1996].

A.1.- Adhesinas afimbriales

Adhesinas afimbriales, o proteínas de membrana externa (OMP) asociadas al patrón AA, han sido descriptas en cepas EAEC de diferentes serotipos [Debroy et al., 1995; Monteiro-Neto et al., 2003; Wai et al., 1996; Chart et al., 1995]. Estos investigadores demostraron que OMPs de 30 y 38 kDa, fueron responsables del patrón AA en algunas cepas EAEC. Una OMP de 18 kDa presente en cepas EAEC pertenecientes a los serotipos O44:H18 y O126:H27, fue asociada al patrón AA en células HEp-2. La hemaglutinación manosa-resistente de eritrocitos humanos expresada en baja temperatura por la cepa prototipo 042 fue asociada con una OMP de 16 kDa llamada criohemaglutinina [Yamamoto et al., 1997; Monteiro-Neto et al., 2003] describieron una OMP de 58 kDa, denominada proteína agregativa 58 (Ap58) responsable de la estructura AA en las cepas EAEC del serotipo O111:H12.

A.2.- Adhesinas fimbriales

En varias cepas EAEC, ha sido demostrada por estudios de microscopía electrónica, la presencia de diferentes fimbrias [Vial et al., 1988; Suzart et al., 2001]. Sólo unas pocas fimbrias de EAEC han sido caracterizadas genéticamente, y las más estudiadas son las fimbrias de adherencia agregativa (AAFs) I, II y III [Bernier et al., 2002., Czeczulin et al., 1997; Nataro et al., 1992]. AAF/I, II y III están codificadas en plásmidos de alto peso molecular y son necesarias para la expresión del patrón AA en las cepas prototipo 17-2, 042 y 55989, respectivamente [Bernier et al., 2002; Nataro et al., 1992; Elias 1999]. AAF/I es responsable del patrón AA en células HEp-2 y hemaglutinación manosa-resistente de eritrocitos humanos [Nataro et al., 1992]. AAF/II se describió en la cepa prototipo 042 como la adhesina responsable del patrón AA en células HEp-2 y en células de mucosa del colon humano, así como de la formación de biofilm en cultivos de tejidos y poliestireno [Czeczulin et al., 1997]. AAF/III también está involucrada en la agregación bacteriana y en el patrón AA en cultivos de células epiteliales. A diferencia de AAF/I y II, AAF/III es un filamento largo, flexible e individual. Otra estructura fimbrial ha sido descripta en la cepa EAEC C1096 atípica. En esta cepa, la adherencia agregativa a las células epiteliales cultivadas y a superficies abióticas está mediada por un pili tipo IV. Un gran número de cepas EAEC carecen de los genes que codifican para las fimbrias, lo que indicaría que podrían expresar adhesinas que aún no han sido totalmente caracterizadas [Uber et al., 2006; Gioppo et al., 2000; Zamboni et al., 2004; Czeczulin et al., 1999; Dudley et al., 2006; Pereira et al., 2008].

A.3.- Formación de biofilm

Otra característica de las cepas EAEC es la capacidad para formar biofilm en las superficies bióticas y abióticas *in vitro* [Nataro et al., 1996; Hicks et al., 1996; Tzipori et al., 1992; Sheikh et al., 2004]. El biofilm de EAEC es un fenotipo multifactorial distinto de los biofilms de *E. coli* no patógenos. Se ha demostrado la implicancia de las AAF/II, fimbrias tipo I, Fis y YafK en la formación de biofilm por la cepa prototipo de 042 [Sheikh et al., 2004]. Fis es una proteína de unión al ADN que participan en la regulación del crecimiento y YafK es una proteína secretada requerida para la transcripción de los genes implicados en la biogénesis de AAF/II [Sheikh et al., 2004]. La adherencia de EAEC a los tejidos intestinales se caracteriza por ser un biofilm compuesto por agregados de bacterias en asociación con una capa de moco espeso [Nataro 1996; Hicks 1996; Tzipori et al., 1992]. Esta característica del biofilm ha sido asociado con la persistencia de diarrea en los casos de infección por EAEC [Kaper et al., 2004].

A.4.- Dispersina, Shf y Irp-2

La dispersina es una proteína inmunogénica secretada de 10,2 kDa codificada por el gen *aap* (proteína anti-agregación), anteriormente conocido como *aspU* [Czeczulin et al., 1999; Sheikh et al., 2002]. Esta proteína es secretada al medio extracelular y se une covalentemente a la superficie bacteriana, neutralizando la carga negativa de la superficie de bacterias y permitiendo la proyección de AAF/II [Velarde et al., 2007].

El gen *shf* presenta homología con dos genes descriptos en *Shigella flexneri* 2a (*shf1* y *shf2*), y codifica para una proteína similar a IcaB de *Staphylococcus epidermidis* relacionada con la formación de biofilms [Czeczulin et al., 1999, Heilmann et al., 1996]..

El gen *irp*-2 de localización cromosomal en la cepa 042 [Czeczulin et al., 1999] codifica una proteína de alto peso molecular Hierro Reprimible 2 (IRP-2) y participa en la biosíntesis de una proteína responsable de la adquisición de hierro en *Yersinia* [Schubert 1998]. Algunos autores demostraron una alta prevalencia de este gen entre las cepas EAEC [Uber et al., 2006], aunque, el papel de la IRP-2 en la patogénesis de EAEC no está dilucidado.

B.- Invasión

EAEC se considera un patógeno no invasivo. Sin embargo algunos autores han demostrado el fenotipo invasivo de cepas EAEC en cultivos celulares [Pereira et al., 2008; Abe et al., 2001; Benjamín et al., 1995]. Benjamin *et al*. [2008], demostraron que las cepas EAEC fueron internalizadas por células HeLa, mediante

componentes del citoesqueleto celular. Estas observaciones, conjuntamente con la descripción de casos de niños con diarrea sanguinolenta por EAEC sugieren que la capacidad de invasión puede ser otro factor de virulencia de algunas cepas EAEC [Cravioto et al., 1991].

C.- Elaboración de enterotoxinas y citotoxinas

Las cepas EAEC producen efectos citotóxicos como vesiculación de las microvellosidades, apertura ampliada de las criptas, y el aumento de la extrusión celular del epitelio [Harrington et al., 2006]. Numerosos factores de virulencia putativos han sido asociados a estos efectos citotóxicos en EAEC como: las toxinas Pet y EAST-1 codificadas por plásmidos [Eslava et al., 1998; Savarino et al., 1993]; la toxina ShET1 codificada en el cromosoma [Fasano et al., 1995; Henderson et al., 1999]; la proteína HlyE [Mueller et al., 2009]; la proteína implicada en la colonización (Pic) una mucinasa ampliamente asociada con *E. coli* y *Shigella* spp [Henderson., 1999], y un sistema de secreción tipo VI [Dudly et al., 2006].

C.1.- Proteína Pet

Se ha demostrado que una proteína de 104 kDa, denominada Pet (del inglés, plasmid-encoded toxin), es necesaria para inducir daño en la mucosa intestinal humana con aumento de la mucosidad, exfoliación de las células y el desarrollo de abscesos en las criptas [Navarro et al., 1998]. La toxina Pet es un miembro de la clase de proteínas autotransportadoras secretadas. La característica de este tipo de proteínas es su propio sistema de secreción [Eslava et al., 1998]. Esta toxina alteraría la célula epitelial ya que induce la contracción del citoesqueleto, la pérdida de la tensión de las fibras de actina, y la liberación de los contactos de coordinación en monocapas de células HEp-2 y HT29/C1, seguido por el redondeo de células y la pérdida de adherencia del cultivo celular.

C.2.- Toxina termoestable enteroagregativa 1 (EAST1)

La toxina EAST-1, esta codificada por el gen *astA* adyacente al gen *pet*, y está presente en una amplia variedad de cepas y patotipos [Czeczulin et al., 1999]. Sin embargo, la presencia de EAST-1 en la cepa EAEC 17-2 que no causó diarrea en voluntarios, sugiere que esta toxina no es el único mediador de la diarrea. EAST-1 es similar a la enterotoxina STa de *E. coli* enterotoxigénico (toxina termoestable a) [Savarino et al., 1993]. Al igual que STa, EAST-1 causa diarrea acuosa. Se une al receptor entérico que es una guanilato ciclasa C, induce

luego un aumento de la concentración de GMPc en las células del intestino dando lugar a la secreción de aniones y perdida de agua al lumen intestinal [Greenberg et al., 1997].

C.3.- Enterotoxina de Shigella 1 (ShET1)

Al igual que la toxina de *Shigella flexneri,* ShET1 de EAEC es una proteína oligomérica formada por una proteína de 20 kDa (SetA) asociada con un pentámero de cinco subunidades de 7-kDa (SetB). ShET1 parece inducir la secreción intestinal a través de AMPc y cMPC. Sin embargo, el mecanismo de acción preciso y detallado sigue siendo desconocido. Filtrados de cultivo de la cepa de *S. flexneri* 2a M4243 causa importante acumulación de líquido en las asas del íleon de conejo, cuando la bacteria se cultiva en medio carente de hierro [Fasano et al., 1997].

C.4.- Hemolisinas

La hemolisina E (HlyE) de *E. coli* es una proteína hemolítica formadora de poro codificada en el gen *hlyE* (*clyA*, *sheA*). En un estudio realizado para determinar si el gen *hlyE* estaba presente en otros patotipos de *E. coli,* se demostró que 19 de 23 (83%) cepas STEC, 7 de 7 (100%) cepas EIEC, 6 de 8 (80%) cepas EAEC, y 4 de 7 (58%) cepas ETEC portaban el gen *hlyE* completo. Sin embargo, el papel de HlyE en EAEC no ha sido determinado. La aparición de *hlyE* en bacterias no patógenas sugiere que HlyE no tendría una función importante en la patogenia.[Ludwig et al., 2004; Von Rhein et al., 2008]
Otra toxina, lábil al calor de 120 kDa fue identificad en las cepas EAEC [Baldwin et al., 1992]. Esta proteína tiene reacción cruzada con anticuerpos anti la región de repeticiones en tándem de alfa-hemolisina de *E. coli* y es capaz de aumentar los niveles intracelulares de calcio y estimular la fosforilación de proteínas a través de quinasas dependientes de calcio en células HEp-2. Los investigadores sugirieron que esta toxina podría desempeñar un papel importante en el desarrollo de la diarrea por EAEC causando cambios celulares que conducen a la muerte de las células intestinales.

C.5.- Proteína implicada en la colonización (Pic)

La proteína Pic implicada en la colonización de las cepas EAEC esta codificada en el cromosoma bacteriano [Czeczulin et al., 1999; Henderson et al., 1999] y se encontró que es idéntica a una proteína denominada Shmu (Shigella mucinasa), que está codificada en la isla de patogenicidad (PAI) de Shigella. A través del análisis funcional de Pic se determinó que esta proteína tiene una actividad de mucinasa y de

hemaglutinación. Fenotipos identificados para Pic sugieren que estaría involucrada en las primeras etapas de la patogénesis y probablemente promueve la colonización intestinal [Henderson et al., 1999; Rajakumar et al., 1997].

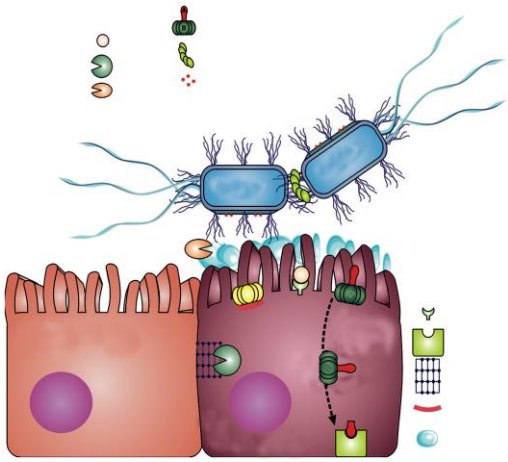


Figura 2: Representación esquemática de los factores de virulencia de EAEC y sus blancos en el epitelio de la mucosa.

1.4.4.- Respuesta inmune

La respuesta inflamatoria inicial a la infección por EAEC es dependiente del sistema inmune innato y del tipo de infección que causa EAEC. El papel de los genes de virulencia putativos y los resultados clínicos no están bien definidos. Sin embargo, la presencia de varios factores de virulencia se correlacionan con concentraciones elevadas de citocinas y marcadores inflamatorios en la materia fecal de adultos y de niños con diarrea, incluyendo interleuquina (IL)-1a, IL-1β, IL-8, interferón (INF)-γ, lactoferrina, leucocitos fecales y sangre oculta [Jiang et al., 2002; Huang 2004]. Se informó que la flagelina de las cepas EAEC induce la secreción de IL-8 en cultivos de células Caco-2 [Steiner et al., 2000]. La IL-8 es una importante quimiocina pro-inflamatoria involucrada en la patogénesis de la EAEC, siendo responsable del reclutamiento de neutrófilos en la mucosa epitelial y facilita la secreción de fluidos intestinales [Kucharzik et al., 2005; Madara et al., 1993]. Curiosamente, los niveles de IL-8 son más altos en las heces de pacientes infectados con cepas aggR o aafA positivas en comparación con las personas infectadas con cepas negativas para estos factores.

1.4.5.- Diagnóstico

Los métodos utilizados para identificar EAEC involucran pruebas *in vitro* de adhesión celular o pruebas basadas en ADN dirigidas a genes que codifican para el proceso de adherencia agregativa. Como las cepas EAEC son heterogéneas [Scaletsky et al., 2002; Suzart et al., 2001] y las secuencias de ADN no están presentes en todas las cepas EAEC, el ensayo de adherencia en células HEp-2 es aún el mejor método para definir esta categoría [Toma et al., 2003].Esta técnica, sin embargo, es muy engorrosa, especialmente para la detección de múltiples colonias procedentes de un gran número de muestras clínicas. Por otra parte, la mala interpretación de los patrones de adherencia puede resultar en la identificación errónea de EAEC.

Se han desarrollado sondas de ADN para la identificación de EAEC. La primera sonda dirigida para hibridar con una región del plásmido codificante del proceso de adherencia, fue desarrollada por Baudry et al. [1990]. En un estudio realizado en Chile, la sonda demostró ser altamente específica (89%) y sensible (99%). Sin embargo en Tailandia, la sensibilidad fue inferior al 50% [Echeverría et al., 1992]. Esto sugiere que existe heterogeneidad de genes que codifican para el proceso enteroagregativo o bien, no todas las cepas analizadas eran en realidad EAEC**.**

También otra estrategia de detección fue utilizar la técnica de PCR para amplificar un fragmento de ADN que hibridaba con la sonda genética EAEC [Schmidt et al. 1995]. La detección de los genes que codifican para la toxina EAST 1, utilizando sondas de ADN o PCR, fue considerada de poca utilidad para la detección de EAEC, dada la alta incidencia de esta toxina en otros grupos de *E. coli* [Savarino et al., 1996].

En la actualidad la PCR es utilizada como técnica de elección para identificar los genes que codifican para los factores de virulencia de EAEC como el plásmido pCVD432, *aggR*,, *pic*,etc [Toma et al., 2003; Pass et al., 2000].

1.4.6.-Tratamiento y profilaxis

Al igual que con todos los demás enteropatógenos que causan diarrea aguda en niños, el apoyo principal para el tratamiento de la infección por EAEC es la rehidratación, preferiblemente la rehidratación oral, seguida por la reintroducción de los alimentos según su tolerancia. Al igual que con otras infecciones autolimitantes, la decisión de usar terapia con antibióticos debe hacerse sobre una base individual. Para la selección del antibiótico debe tenerse en cuenta la edad de la persona, la región del mundo donde la infección fue adquirida y los patrones locales de susceptibilidad antimicrobiana. En general los viajeros procedentes de países desarrollados, que visitan América Latina deben recordar los principios básicos de higiene, evitar el agua de grifo para beber reemplazándose por agua embotellada y cocinar correctamente los alimentos. Hay que tener en cuenta que incluso los alimentos cocinados, servidos en restaurantes pueden llegar a contaminarse debido a la condiciones

antihigiénicas. En los estudios de diarrea del viajero, la infección por EAEC responde al tratamiento con antibióticos [Glandt et al., 1999]. La mayoría de las cepas son susceptibles a las fluoroquinolonas, azitromicina y la rifaximina. Sin embargo, la prevalencia de resistencia antibiótica en cepas EAEC aisladas de niños de países en desarrollo es alta [Haider et al., 1991]. Aunque los antibióticos son muy eficaces en la prevención de la diarrea del viajero, su costo, efectos secundarios y la contribución al desarrollo de la resistencia [Wagner et al., 2009] limita su uso de rutina.

1.4.7.-Epidemiología e impacto en América Latina

Las cepas EAEC han sido identificadas en todas las regiones del mundo donde se han estudiado. Los niños y adultos que viven en países en desarrollo, así como los viajeros que regresan desde estos países son susceptibles a la infección por EAEC [Glandt et al., 1999; Adachi et al., 2001; Scaletsky et al., 2002; Mathewson et al., 1987]. EAEC también puede producir una infección asintomática persistente en adultos y niños [Samie et al., 2007; Samie et al., 2008]. En EE.UU, un estudio reciente mostró que cepas EAEC con hibridación con sonda genética positiva, pero con adherencia no definida en HEp-2, fueron más frecuentemente identificadas en niños menores de cinco años con diarrea aguda que en controles sanos de igual edad [Oberhelman et al., 1998; Cohen et al., 2005]. Aunque cepas EAEC atípicas han sido identificadas en terneros, lechones y caballos, los animales no han sido implicados como reservorio de este patógeno [Uber et al., 2006]. Los alimentos contaminados parecen ser la principal fuente de infección y EAEC ha sido asociada a brotes de diarrea relacionados con alimentos en numerosas partes del mundo [Smith et al., 1997; Itoh et al., 1997]. En América Latina, las cepas EAEC son aislamientos bacterianos comunes en niños con diarrea y han sido identificadas en Colombia [Gomez-Duarte et al.,], México [Cravioto et al., 1991; Mathewson et al., 1989], Guatemala [Lima et al., 1992], Brasil [Scaletsky et al., 2002; Wanke et al., 1991; Fang et al., 1995; Gomez et al., 1998], Chile [Levine et al., 1993], Perú [Ochoa et al., 2009], Argentina [Ruttler et al., 2002], Ecuador [Bourgeois et al., 1993] y Jamaica [Adachi et al., 2001].

Además de las complicaciones agudas de la diarrea como deshidratación y muerte, EAEC también puede causar diarreas persistentes que pueden dar lugar a desnutrición y retraso del crecimiento. EAEC también ha sido asociada a diarrea crónica en pacientes infectados por HIV [Samie et al., 2007; Mathewson et al., 1995; Bernier et al., 2002]. EAEC se puede identificar entre el 19% y 33% de los casos de diarrea del viajero, en función de la región del mundo visitada [Adachi et al., 2001; Mathewson et al., 1985; Jiang et al., 2002]. En América Latina, la proporción de casos de diarrea del viajero asociados a EAEC se encuentra en el 25% de los viajeros, que es significativamente superior a las tasas observadas en los viajeros que visitan África, donde la proporción es de menos del 2%, y el sur de Asia (15%) [Shah et al., 2009].

1.5- *Escherichia coli* productor de toxina Shiga (STEC)

Desde hace más de dos décadas, *Escherichia coli* productor de toxina Shiga (STEC) es considerado un patógeno emergente transmitido por alimentos, asociado a casos esporádicos y brotes de diarrea, colitis hemorrágica (CH) y síndrome urémico hemolítico (SUH) [Griffin et al., 1991; Tarr et al., 1995].

Fue descrito por primera vez por Konowalchuk et al. [1977], quienes demostraron que cepas de *E. coli* de los serogrupos O18, O26, O111 y O128, aisladas de niños con diarrea y de cerdos con edema de pulmón, producían una toxina a la que se denominó Verotoxina, debido al efecto citotóxico en células Vero. Pocos años después se aislaron cepas de *E. coli* que producían un efecto citotóxico en células HeLa, el cual podía ser neutralizado por un antisuero anti-toxina Shiga de *Shigella dysenteriae* tipo 1 [O´Brien et al., 1982], por lo cual se las llamó *Shiga-like toxin*. En 1982, se produjeron dos brotes de CH en Michigan y Oregon, EE.UU., causados por el consumo de hamburguesas, identificándose por primera vez el serotipo de *E. coli* O157:H7 como patógeno humano [Riley et al., 1977].

1.5.1- Serotipos

Escherichia coli O157:H7 es el prototipo de más de 150 serotipos que comparten el mismo potencial patogénico. Las cepas STEC asociadas a enfermedades severas en el hombre pertenecen a la categoría de EHEC [WHO, 1997]. Por otra parte, es el serotipo aislado más frecuentemente y al que se le atribuye la ocurrencia de la mayoría de los grandes brotes [Barret et al., 1994; Manning et al., 2008; Watanabe et al., 1996].

Karmali et al. [2003], propusieron una clasificación para los serotipos de STEC en 5 seropatotipos (A-E), de acuerdo a su potencial patogénico y epidémico. El seropatotipo A (O157:H7 y O157: NM) es considerado como el más virulento asociado con una mayor incidencia en enfermedad humana severa, y con una alta frecuencia en brotes. El seropatotipo B (O26:H11/NM; O45:H2/NM; O103:H2/H11/H25/MN; O111:H8/NM; O121:H7/H19; y O145:NM) se asocia con enfermedad humana grave, pero con una frecuencia más baja, y es poco común en brotes. Los seropatotipos C (O91:H21, O104:H21 y O113:H21, entre otros), y D tienen una baja incidencia en enfermedad humana, y rara vez se asocian a brotes. Por último, el seropatotipo E se compone de muchos serotipos que se encuentran en el reservorio animal y en los alimentos, pero que hasta el presente no han sido implicados en enfermedad humana.

1.5.2.- Patogenia

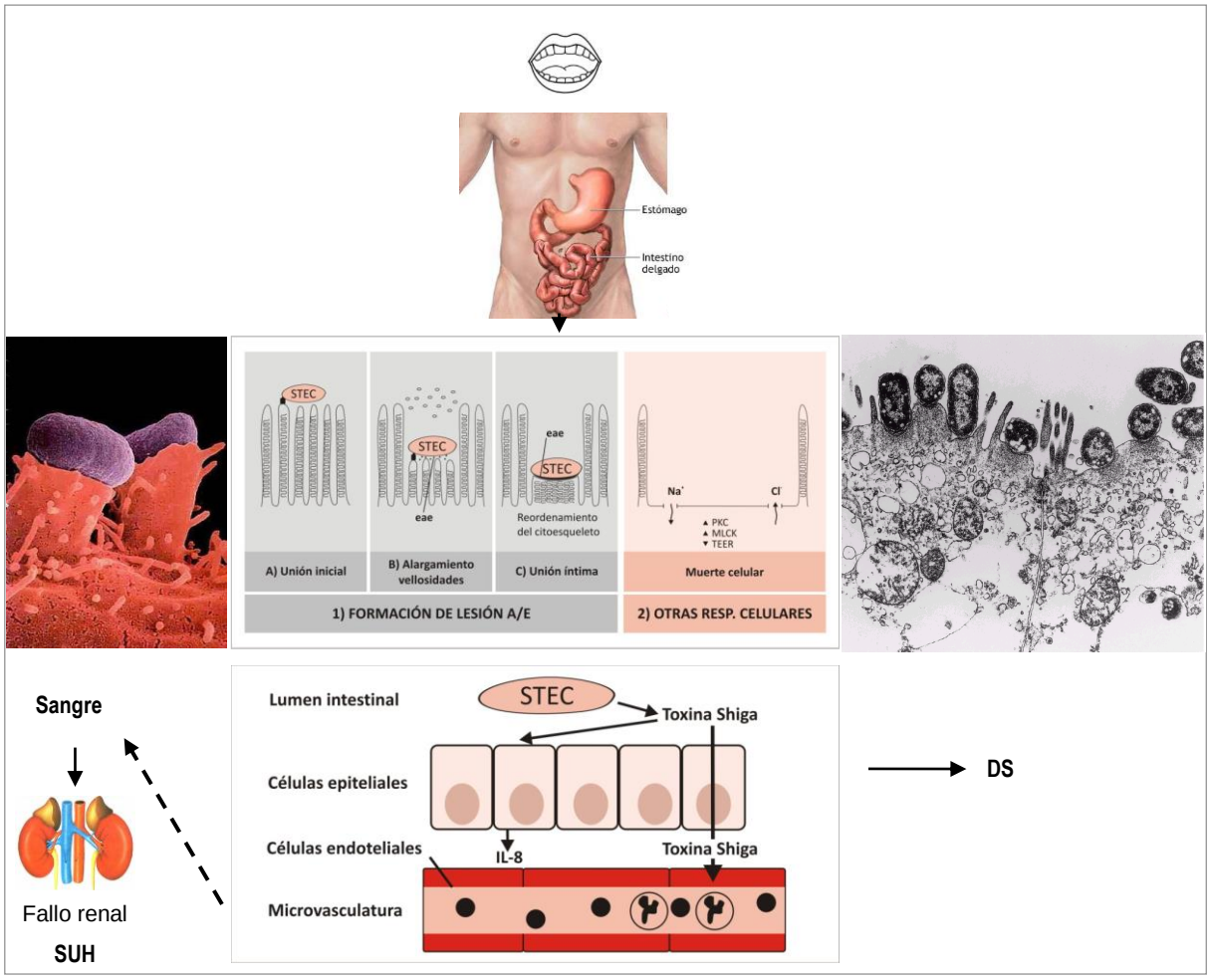
Al igual de lo que ocurre con otras infecciones entéricas asociadas a *E. coli*, se considera que el proceso de enfermedad involucra la colonización del intestino, y el daño debido a las toxinas. La colonización es el proceso por el cual STEC supera los mecanismos de defensa del huésped y se establece en el intestino. La acidez gástrica es un importante mecanismo de defensa del huésped en el tracto gastrointestinal, y la resistencia a los ácidos es una característica general de *E. coli* O157 y de otros serotipos de STEC. La adherencia a las células epiteliales intestinales es un evento temprano en la infección por STEC y ha sido investigado extensamente, principalmente mediante el uso de líneas celulares de diversos orígenes y también *in vivo*. Las cepas de STEC alcanzan el intestino y se adhieren a los enterocitos sin invadirlos La adherencia bacteriana, mediada por fimbrias causa el alargamiento de las microvellosidades. Seguido a la translocación del receptor Tir, el mismo se integra a la membrana plasmática adoptando una forma de pelo enrollado [Hartland et al., 1999]. El dominio central extracelular de Tir actúa como receptor de la adhesina intimina de la bacteria [Frankel et al., 2001]. Simultáneamente, Tir interactúa mediante sus dominios intracelulares N- y C-terminal, con diversas proteínas del citoesqueleto uniendo íntimamente la bacteria al enterocito. Además, se produce la desorganización de las microvellosidades con producción de la lesión AE (del inglés, *attaching and efacement*) y acumulación de filamentos de actina en el citoplasma. Esta reducción de la superficie de absorción causa una diarrea sin sangre.

La toxina Shiga liberada se une, mediante el pentámero B, a la célula epitelial del intestino por interacción con el receptor Gb3 que se encuentra en la membrana apical. La toxina es luego internalizada en una vesícula endocítica, y transportada al aparato de Golgi, donde la subunidad A es clivada proteolíticamente liberando el fragmento A1, el cual actúa sobre la subunidad ribosomal 60S, inhibiendo la síntesis proteica y provocando la muerte celular.

La toxina puede también ser translocada desde la membrana apical a la superficie basolateral, con inducción de interleuquina-8 (IL-8), que contribuye a la acumulación de leucocitos en la pared intestinal. Se produce un daño en las células endoteliales de los vasos sanguíneos provocando diarrea sanguinolenta.

Stx entra a la circulación sanguínea y es transportada a distintos órganos blanco cuyas células endoteliales poseen el receptor Gb3. El LPS bacteriano y las citoquinas del huésped aumentan la sensibilidad a las Stxs incrementando la disponibilidad de dichos receptores. En el riñón se encuentran altos niveles de Gb3, particularmente en la región cortical, donde se observan las principales lesiones en los pacientes con SUH. Las lesiones histopatológicas ocurren por interacción de la Stx con las células endoteliales de los vasos sanguíneos, éstas se hinchan y se desprenden a nivel del glomérulo. Simultáneamente se produce un depósito de fibrina y de plaquetas en la microvasculatura renal, se oclusionan los capilares y se reduce el flujo sanguíneo, provocando

insuficiencia renal y ruptura de los glóbulos rojos. También se observan lesiones trombóticas, particularmente en la microvasculatura del intestino, cerebro y páncreas.



1.5.3.- Mecanismos y factores de virulencia involucrados en la interacción de STEC con la célula huésped

Las toxinas Shiga (Stx) son el principal factor de virulencia de STEC [Calderwood et al., 1996]. Poseen estructura de subunidades A-B, y están codificadas por bacteriófagos insertados en el cromosoma bacteriano. La subunidad A (33 KDa) es la parte biológicamente activa, y la B (7,5 KDa), presente en cinco copias, es la que se une al receptor celular específico globotriaosilceramida (Gb3). Se clasifican en dos tipos, Stx1 y Stx2.

Las cepas STEC de origen humano, animal o de alimentos pueden producir Stx1, Stx2 o variantes, solas o en combinación de dos o más toxinas Se han descripto los siguientes subtipos o variantes de toxina: Stx1a (stx_{1a}), Stx1c (stx_{1c}), Stx1d (stx_{1d}), Stx2a (stx_{2a}), Stx2b (stx_{2b}), Stx2c (stx_{2c}), Stx2d (stx_{2d}), Stx2e (stx_{2e}), Stx2f (stx_{2f}) y Stx2g (stx_{2g}) [Scheutz et al., 2012]. Los miembros de la familia de Stx presentan grandes diferencias en su toxicidad en tejidos celulares y en animales. Stx2 tiene una actividad citotóxica de 100 a 1000 veces superior a Stx1. Se ha demostrado que cepas STEC Stx2c son menos virulentas y causan diarrea sanguinolenta menos frecuentemente que cepas Stx2 o Stx2/Stx2c. Otros estudios sugieren que individuos infectados con cepas Stx2 presentan mayor riesgo de desarrollar SUH [Nishikawa et al., 2000]. Por lo tanto, la prevalencia de cepas STEC de determinados genotipos *stx*, junto a otros factores de riesgo de evolución a SUH, podrían explicar la alta incidencia de enfermedad humana y la severidad de los casos clínicos que se presentan en ciertas regiones.

El plásmido pO157 de 90 Kb, se encuentra en la mayoría las cepas de STEC O157:H7 y contiene diversos genes que codifican para los siguientes factores de virulencia: *esp*P (serina proteasa extracelular), *kat*P (catalasa-peroxidasa), *hly*A (enterohemolisina), *etp* (sistema de secreción tipo II), y para una fimbria que podría estar involucrada en la etapa inicial de colonización de los enterocitos [Schmidt et al., 1995]. Algunos factores de adherencia intestinal están codificados en el locus LEE del cromosoma. Al igual que en EPEC, el gen *eae* codifica la proteína intimina responsable de la unión íntima de la bacteria al enterocito y de la desorganización de las microvellosidades con producción de la lesión AE. Hay al menos 17 tipos de intimina (α1, α2, β1, β2, γ1, γ2/θ, δ/κ, ε, ζ, η, η2, ι, λ, ν, ξ, o). Sin embargo, la presencia de la región LEE no sería esencial para la patogénesis, dado que un gran número de cepas STEC-LEE negativas son capaces de causar enfermedad severa y ocasionalmente brotes [Keskimaki et al., 1997; Paton et al., 1999]. Sin embargo, la gran mayoría de las cepas implicadas en casos de CH y SUH son *eae*-positivas. Por lo tanto, se ha identificado al gen *eae* como un factor de riesgo de progresión a SUH. Otros factores de adherencia están codificados fuera de la región LEE como las adhesinas Iha (del inglés, *iron regulated gene A homologue adhesin*), Efa1 (del inglés, *EHEC factor for adherence*) [Nicholls et al., 2000], LPFO157/OI-141, LPFO157/OI-154 y LPFO113/OI-154 (del inglés, *long polar fimbria*) [Doughty et al., 2002; Torres et al., 2002]. Otras tres adhesinas, ToxB (proteína identificada en pO157) [Tatsuno et al., 2001], Saa (del inglés, *STEC autoaggutinating adhesin*) identificada en cepas LEE

negativas [Paton et al., 2001], y Sfp (del inglés, *sorbitol fermenting plasmid*) [Jenkins et al., 2003] están codificadas en el megaplásmido de cepas STEC.

En Argentina, *E. coli* O157:H7 es el principal serotipo (> 70% de los casos), seguido de O145:NM. Entre las cepas STEC O157, el genotipo prevalente es stx_2/stx_{2c}/*eae*/*ehxA* (> 80%), y entre las cepas STEC no-O157 stx_2/*eae*/*ehxA* (>70%).

1.5.4.- Reservorio y transmisión

Los rumiantes en general, y el ganado vacuno en particular, son descritos como los principales reservorios de STEC. En distintos países, entre los que se incluye a Argentina, se realizaron numerosos estudios sobre la prevalencia de STEC que permitieron confirmar el rol del ganado vacuno como principal reservorio [Chinen et al., 2003; Masana et al., 2010; Meichtri et al., 2004; Parma et al., 2000] En un importante muestreo realizado en nueve frigoríficos exportadores de Argentina se encontró una prevalencia de STEC O157 del 4,1% en materia fecal y del 2,6% en carcasas bovinas. Para STEC no-O157 la prevalencia fue del 22,3% en materia fecal y del 9,0% en carcasas [Masana et al., 2010; Masana et al., 2011]. Si bien cerdos, aves, perros y gatos no son reservorios importantes de STEC [Beutin et al., l999], se demostró que la interacción entre mascotas y niños es un factor de riesgo para el contagio [Bentancor et al., 2012].

La principal vía de transmisión de STEC O157 y no-O157 son los alimentos contaminados, como por ejemplo, carne molida, productos cárnicos crudos o insuficientemente cocidos, hamburguesas, embutidos fermentados, morcilla, leche no pasteurizada, yogur, quesos, mayonesa, papas, lechuga, brotes de soja y alfalfa, jugos de manzana no pasteurizados, y agua, entre otros [Gyles et al., 2007]. Otras formas de transmisión incluyen el contacto directo del hombre con los animales, la contaminación cruzada durante la preparación de los alimentos, la transmisión persona a persona por la ruta fecal-oral, y la contaminación fecal de aguas de recreación o aguas de pozo.

Diversos trabajos han descrito que la excreción de STEC O157 en humanos es prolongada e intermitente [Swerdlow et al., 1997]. En niños pequeños, a diferencia de lo que ocurre en niños mayores y adultos, el tiempo de excreción de O157 supera ampliamente el tiempo de resolución de los síntomas. Toda persona con infección por STEC, sintomática o asintomática, no deberá obtener el alta médica hasta no tener dos coprocultivos negativos sucesivos con intervalos de 48 h entre ellos. Es importante destacar que la dosis infectiva de este grupo bacteriano para ocasionar enfermedad es de 10 a 100 bacterias por gramo de alimento.

1.5.5.- Aspectos clínicos

En las infecciones por STEC, el período de incubación promedio es de 3 días (con un rango de 1-8 días), y el cuadro clínico incluye un período de 1 a 2 días de vómitos, fiebre baja o ausente, dolores abdominales severos, diarrea sin sangre, y evidencia de edema de la mucosa colónica como síntomas iniciales, seguidos por diarrea sanguinolenta o colitis hemorrágica durante 4 a 6 días. Aunque en la mayoría de los casos, la diarrea por STEC es autolimitada, aproximadamente del 5 al 10% de los niños infectados evolucionan a SUH, para el cual no existe un tratamiento específico, sino de sostén. Entre los factores predictivos de evolución a SUH se incluyen: edades extremas, leucocitosis, tratamiento con agentes reductores de motilidad o antidiarreicos, fiebre, período prodrómico corto, y en algunos casos diarrea sanguinolenta. El genotipo de la toxina de la cepa virulenta también influye en la evolución a SUH. Estudios poblacionales sugieren que aproximadamente el 90% de los casos de SUH están precedidos por diarrea. Los niños constituyen el grupo más vulnerable, con una mayor incidencia de infecciones sintomáticas por STEC y riesgo alto de evolución a SUH [Mead and Griffin, 1998].

El SUH, descrito por primera vez en 1955 [Gasser et al., 1955], es una enfermedad de comienzo agudo con anemia hemolítica microangiopática, plaquetopenia y daño renal, que habitualmente puede seguir o no a un episodio de diarrea con o sin sangre, en un niño previamente sano. Las manifestaciones comunes son: palidez, petequias, hematomas, oliguria, edema, hipertensión arterial, y cambios neurológicos como letargia o convulsiones [Comité de Nefrología, 1995]. Los criterios de laboratorio para el diagnóstico de SUH son: 1) hemoglobina menor de 10 mg/dl o hematocrito menor de 30% o caída de al menos 5 puntos, con cambios microangiopáticos en el frotis de sangre periférica (esquistocitos, células en casco o fragmentados); 2) injuria renal aguda evidenciada por hematuria, proteinuria, uremia mayor de 50 mg/dl en ausencia de deshidratación o creatinina mayor de dos desviaciones estándar respecto a edad y sexo, o aumento del 50% de los valores al inicio de la enfermedad; y 3) recuento de plaquetas menor a 150.000/mm^3. Aproximadamente la mitad de los pacientes con SUH requiere diálisis y el 75% requiere transfusión sanguínea. En los últimos años, el diagnóstico precoz de la enfermedad y el mejor manejo de la insuficiencia renal aguda y de la anemia, disminuyó la letalidad durante el período agudo, siendo en la actualidad del 3 al 5%. Sin embargo, un 5% de niños con SUH desarrolla insuficiencia renal crónica, requiriendo en pocos años procedimientos dialíticos o transplante renal. Otro 20% continúa con microhematuria y grados variables de proteinuria, pudiendo desarrollar insuficiencia renal crónica terminal en lapsos variables que pueden llegar a décadas [Kaplan et al., 1990; Spizirri et al., 1997]. Esta patología implica grandes costos económicos para los sistemas de salud, lo cual tiene un impacto importante en los países en desarrollo.

1.5.6.- Diagnóstico

La mayoría de las cepas STEC O157 no fermentan el sorbitol y no tienen actividad de β-glucuronidasa, y en placas de agar MacConkey Sorbitol (SMAC) desarrollan colonias pequeñas, incoloras y translúcidas. En cambio, los serotipos no-O157 en general fermentan el sorbitol, y poseen actividad de β-glucuronidasa desarrollando colonias pequeñas y rosadas en ese medio.

Se pueden aplicar métodos inmunocromatográficos comerciales para la detección rápida de STEC O157 y no-O157 a partir del medio de enriquecimiento.

El diagnóstico presuntivo de *E. coli* O157 de colonias sospechosas en SMAC se puede realizar por seroagrupamiento por aglutinación en lámina con antisuero anti-O157 o reactivo de látex. La metodología de PCR múltiple se utiliza como técnica de tamizaje para detectar los genes stx_1, stx_2 y rfb_{O157}. PCR accesorias se utilizan para detectar otros genes de virulencia, como los genes *eae*, *ehx*A, *saa*, $fliC_{H7}$, entre otros, lo que permite la caracterización molecular de la cepa.

La sensibilidad del procedimiento de aislamiento de *E. coli* O157:H7/NM puede aumentarse aplicando la técnica de separación inmunomagnética (SIM).

1.5.7.- Tratamiento y profilaxis

Hasta el presente no existe una terapia específica para las infecciones por STEC. Si bien, *E. coli* O157 es susceptible a la mayoría de los agentes antimicrobianos comúnmente utilizados, aún no se confirmó que la antibioticoterapia aporte algún beneficio para el paciente. Por otra parte, algunos autores demostraron que dicho tratamiento puede precipitar la evolución a SUH. Por ejemplo, trimetoprima-sulfametoxazol estimula la liberación de Stx *in vitro*. Tampoco se deben usar agentes antidiarreicos, que disminuyen la motilidad intestinal, pues estudios retrospectivos señalan un riesgo aumentado de evolución a SUH. En el período agudo del SUH, el tratamiento está basado en el control de las alteraciones fisiopatológicas como ser la restricción de agua y sal, las transfusiones de sedimento globular, la diálisis peritoneal y el adecuado aporte calórico-proteico. Actualmente se hallan en etapa de desarrollo la producción de vacunas para prevenir la infección por STEC.

Las principales medidas para controlar la transmisión de STEC y prevenir la infección son: a) aplicar buenas prácticas de manufactura y de higiene, y establecer puntos críticos de control durante toda la cadena de producción del alimento; b) asegurar una correcta y homogénea cocción de la carne. La bacteria se destruye a 68,3ºC; c) utilizar distintos utensilios de cocina para trozar la carne cruda y para alimentos cocidos, evitando así la contaminación cruzada; d) controlar el uso de leche y derivados lácteos correctamente pasteurizados, y conservar la cadena de frío; e) consumir jugos de frutas pasteurizados; f) lavar cuidadosamente las frutas y

verduras; g) asegurar la correcta higiene de las manos y utensilios de cocina; h) lavar las manos con agua y jabón luego de ir al baño, luego del contacto con animales en granjas educativas, zoológicos y mascota; i) evitar el hacinamiento en instituciones cerradas (jardines maternales, jardines de infantes, escuelas, geriátricos, cárceles, etc.); j) evitar la concurrencia de personas con diagnóstico bacteriológico positivo de STEC a instituciones cerradas; k) evitar el uso de antimicrobianos y antidiarreicos; l) educar a médicos, microbiólogos, personal de plantas elaboradoras de alimentos y restaurantes, de jardines maternales, de infantes y geriátricos, y la comunidad en general, sobre los riesgos que implica la infección por STEC; ll) consumir agua potable; m) utilizar aguas recreacionales habilitadas; n) fomentar campañas de educación y prevención en jardines maternales, jardines de infantes, escuelas primarias, secundarias, y en establecimientos donde se expongan animales.

1.5.8.- Epidemiología e impacto en América Latina

Los sistemas de vigilancia varían enormemente entre países, por lo tanto las comparaciones de la incidencia de las enfermedades asociadas a STEC deben realizarse cuidadosamente.

En América Latina, las infecciones por STEC son endémicas y contribuyen a la carga del síndrome diarreico agudo en niños menores de 5 años de edad. Además, son responsables del 2% del total de casos de diarrea aguda, y en algunos estudios del 20 al 30% de las diarreas con sangre [Guth et al., 2010]. El SUH es endémico en algunos países de la región del Cono Sur, y la notificación sólo es obligatoria en Argentina, Bolivia, Chile y Paraguay.

En Argentina, las enfermedades asociadas a STEC son un grave problema de Salud Pública. La notificación de los casos de SUH es obligatoria, inmediata e individualizada (Resolución Nº 346/00) al Sistema Nacional de Vigilancia de la Salud (SNVS 2.0), en la Plataforma SISA (Sistema Integrado de Información Sanitaria Argentino). Todos los registros de los sectores involucrados en las acciones de prevención, promoción, investigación y control de los eventos a vigilar, incluyendo la vigilancia centinela en 25 UCSUH localizadas en 16 provincias, se realizan en una misma plataforma en tiempo real. La notificación comienza por la identificación del ciudadano en el RENAPER. Este sistema integra la información clínica, epidemiológica y del laboratorio. La notificación de las diarreas sanguinolentas asociadas a STEC también son de notificación obligatoria e inmediata al SNVS 2.0.

El SUH típico (post-entérico, SUH D+), endémico en nuestro país, es la primera causa de insuficiencia renal aguda en niños y la segunda de insuficiencia renal crónica. En la última década, se reportaron anualmente entre 300 a 400 casos nuevos. La incidencia es la más alta a nivel mundial con una tasa poblacional de

aproximadamente 0,8 casos/100.000 habitantes y 7,29 casos/100.000 niños menores de 5 años. La letalidad es del 1 al 5%. El SUH no sólo se observa en niños, sino también en adolescentes y en personas ancianas. Se considera como factor desencadenante de enfermedad por STEC a la falta de inmunidad en los niños y la disminución o pérdida de la misma en las personas adultas. Si bien la infección por STEC puede afectar a niños de ambos sexos, se demostró que las niñas son más propensas a enfermar que los niños [Rowe et al., 1991]. La infección por STEC muestra una variación estacional, con aumento de casos en primavera y verano, épocas que coinciden con el período en que aumenta la portación de STEC en el ganado bovino.

En las últimas décadas, surgió un nuevo escenario de riesgo debido a la evolución bacteriana que permitió la emergencia de un clon hipervirulento de O157 descrito después del brote asociado al consumo de espinacas en EE.UU. en el 2006 [Manning et al., 2008]. Dicho clon está distribuido en todo el mundo, incluida Argentina [Mellor et al., 2012]. Pianciola et al. (2014) describieron la circulación casi exclusiva (> 90%) de cepas de *E. coli* O157 que pertenecen al clado hipervirulento 8 en la provincia de Neuquén, Argentina, región con una de las mayores incidencias de SUH en todo el mundo. También informaron la presencia de factores de virulencia putativos en frecuencias más altas que las reportadas previamente. Recientemente, el mismo grupo ha demostrado una alta prevalencia de clado 8 en cepas humanas de otras regiones de Argentina y una situación similar en el reservorio bovino [Pianciola et al., 2016]. Este marcado predominio en Argentina de cepas STEC O157 con características de hipervirulencia, puede estar relacionado con la alta prevalencia de SUH en el país. Esta información puede implicar que un linaje de STEC O157 ha adquirido un nuevo conjunto de factores que contribuyen a la alta virulencia observada.

Por otra parte, en el año 2011, un brote masivo de diarrea y SUH ocurrió en Alemania y otros 13 países europeos, EE.UU. y Canadá, asociado al consumo de brotes de fenogreco en ensaladas. La caracterización de la cepa O104:H4 causal reveló una inusual combinación de factores de virulencia típicos de *E. coli* enteroagregativo y la capacidad de producir Stx2 lo que le otorgó una gran capacidad patogénica [Scheutz et al., 2011]. En Argentina, se informó la detección de 19 cepas de EAEC-*stx* del serotipo O59:NM[$fliC_{H19}$] desde el año 2005, asociadas a enfermedad humana incluidos casos de SUH [Carbonari et al., 2018].

CAPÍTULO II - AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE *Escherichia coli* DIARREIGÉNICO

1.- *Especímenes*

Materia fecal:

a) **Evacuación espontánea**: Recolectar 2 g de materia fecal con una espátula y colocarla en un recipiente estéril. La muestra debe permanecer refrigerada a 4ºC hasta su procesamiento. Si la muestra no es procesada dentro de las 2 h de recolectada, deberá ser colocada utilizando un hisopo estéril en un medio de transporte (Cary-Blair, Stuart, Amies o solución salina tamponada con glicerol). Si el procesamiento se efectúa dentro de los 2-3 días, el medio de transporte deberá ser conservado refrigerado a 4ºC. Si el espécimen no es analizado en ese lapso de tiempo deberá mantenerse congelado a -70ºC.

b) **Hisopado rectal**: Tomar la muestra con hisopo, conservarlo en un medio de transporte y mantenerlo refrigerado hasta su procesamiento. Si el niño usa pañal, tomar la muestra que queda en el mismo con hisopo o con espátula.

Recomendaciones:

- Recolectar la materia fecal lo antes posible después del establecimiento de la diarrea.
- El paciente no debe estar con tratamiento antibiótico. Recolectar la muestra después de suspender la antibioticoterapia por no menos de 48 h.

2.-*Procesamiento*

2.1. - *Aislamiento*

Medios

- Agar MacConkey (MAC)
- Agar MacConkey sorbitol (SMAC)
- Caldo tripticasa de soja (CTS)
- CTS con cefixima 0,05 mg/l $_{(medio)}$ y telurito de potasio 2,5 mg/l $_{(medio)}$ [CT-CTS]

Materiales y equipamiento

- Estufa de cultivo a 37ºC
- Ansas de rulo

Procedimiento	**Comentarios**
1. Realizar una suspensión de la muestra de materia fecal en solución fisiológica.	
2. Sembrar una alícuota de la suspensión en placa de MAC luego del enriquecimiento en CTS (a 37ºC por 6 h).	• A partir de la siembra en placas de agar MAC y SMAC se realizará el procesamiento para el aislamiento e identificación de STEC, EPEC, ETEC, EIEC y EAEC.
3. Realizar la siembra de la suspensión en forma directa en placa de agar SMAC y luego del enriquecimiento en CTS (a 37ºC por 6 h) y en CT-CTS (a 37ºC por 6 h).	• El agregado de cefixima y telurito de potasio al medio de enriquecimiento proporciona mayor sensibilidad y especificidad en la recuperación de STEC O157.
4. Incubar las placas de agar MAC y SMAC a 37ºC por 18 h.	
5. Observar morfología y características fenotípicas de las colonias aisladas en la placa de agar MAC.	• En agar MAC los microorganismos fermentadores de lactosa desarrollan colonias pequeñas y rosadas en 24 h. En cambio los no fermentadores desarrollan colonias pequeñas, incoloras y translúcidas. • La observación de colonias no fermentadoras de lactosa (LAC-) podría indicar la presencia sospechosa de EIEC o *Shigella* spp. (Continuar a partir del paso N°18)
6. Observar morfología y características fenotípicas de las colonias aisladas en las placas de agar SMAC.	• La mayoría de las cepas STEC O157 no fermentan el sorbitol en 24 h. En la placa de SMAC desarrollan colonias pequeñas, incoloras y translúcidas. En cambio, microorganismos fermentadores de sorbitol, desarrollan colonias pequeñas y rosadas.
7. Realizar el diagnóstico presuntivo de *E. coli* O157 de las colonias no fermentadoras de sorbitol por aglutinación en lámina con antisuero anti-O157 (Ver Procedimiento de Serotipificación).	• Es importante comunicar inmediatamente al médico (a las 24 h de realizado el coprocultivo) la presencia presuntiva de *E. coli* O157 asociado a un caso de diarrea con o sin sangre, o colitis hemorrágica, para vigilar

la probable evolución a SUH mediante parámetros bioquímico-clínicos, y el control del grupo familiar.

- Se debe tener en cuenta que el suero anti-O157 da reacción cruzada con cepas de *Escherichia hermanii*. Cuando se observan colonias no fermentadoras de sorbitol con seroagrupamiento positivo con el antisuero anti-O157 se debe realizar la diferenciación bioquímica entre *E. coli* y *E. hermanii*. (Ver Procedimiento de Identificación Bioquímica).

8. Tomar una muestra de la zona de crecimiento confluente de las placas de MAC y de SMAC; y de las colonias presuntivas para extracción de ADN y posterior realización de las técnicas de PCR múltiple de tiempo final: mPCR-1 (*eae* / *lt* / *st*h / *st*p), mPCR-2 (*IpaH* / *aggR* / stx_1 / stx_2) y mPCR-STEC stx_1 / stx_2 / rfb_{O157}; o de PCR en tiempo real: mRT-PCR stx_1 / stx_2. (Ver Preparación de la muestra para PCR)

- Se utilizan las tres técnicas de PCR múltiple como tamizaje para detectar los siguientes genes; mPCR-1 *eae* positivo para EPEC y STEC; *lt*, *st*h, *st*p para ETEC; mPCR-2: *Ipa*H para EIEC; *aggR* para EAEC y stx_1, stx_2 para STEC; y mPCR stx_1 / stx_2 / rfb_{O157}, positivos para STEC. (Ver algoritmo para el diagnóstico y caracterización de *E. coli* diarreigénico). Es importante realizar las tres mPCR para completar el estudio de diagnóstico de DEC y de esta manera también poder detectar híbridos (cepas con características de feno-genotípicas de dos categorías de DEC) o presencia en una misma muestra de dos patotipos diferentes (co-infección). La PCR en tiempo real: mRT-PCR stx_1 / stx_2 es una opción alternativa para aplicar en la etapa de tamizaje de cepas STEC.

9. Realizar la mPCR-1 (*eae* / *lt* / *st*h / *st*p) y la mPCR-2 (*IpaH* / *aggR* / stx_1 / stx_2) (Ver Protocolos mPCR-1 y mPCR-2)

- Si se obtiene señal positiva por PCR múltiple de la zona confluente se deberá identificar la colonia positiva correspondiente. Para tal fin, realizar PCR de colonias aisladas. Si no se observan colonias típicas, realizar un nuevo aislamiento de la zona de cultivo confluente de la cual se obtuvo señal positiva.

10. Realizar la confirmación bioquímica de las colonias con señal positiva por algunas de las dos mPCR. (Ver Procedimiento de Identificación Bioquímica)

- Si se detecta una colonia con señal positiva para el gen *IpaH*, se deben incorporar pruebas bioquímicas diferenciales con *Shigella* spp. (Ver Procedimiento de Identificación Bioquímica)

11. Determinar el antígeno somático O por aglutinación en lámina con los antisueros polivalente o monovalentes disponibles (Ver Procedimiento de Serotipificación)

12. Determinar la movilidad de la cepa aislada utilizando el medio de Craigie. Si la cepa es móvil, se deberá determinar el antígeno flagelar H. (Ver Procedimiento de Serotipificación).

- La detección del antígeno H requiere de una estimulación previa de la movilidad de la cepa mediante varios pasajes en el medio de Craigie.

13. Determinar la sensibilidad de las cepas a los antimicrobianos. (Ver Pruebas de Sensibilidad)

14. Realizar la PCR-STEC (Ver los protocolos de PCR stx_1 / stx_2 / rfb_{O157} y de RT-PCR-STEC stx_1 / stx_2)

- Es importante que aquellas muestras de un caso de SUH y/o sus contactos, que hayan resultado negativas por las PCR-STEC (stx_1 / stx_2 / rfb_{O157}) y RT-PCR-STEC stx_1 / stx_2, se deriven al Laboratorio Nacional de Referencia para que puedan aplicarse técnicas alternativas para aumentar la sensibilidad en el aislamiento de STEC.

15. Realizar la confirmación bioquímica de las colonias presuntivas con señal positiva para stx_1 y/o stx_2 y/o rfb_{O157} por mPCR-STEC. (Ver Procedimiento de Identificación Bioquímica)

- Si se obtiene señal positiva por mPCR de la zona confluente se deberá identificar la colonia positiva correspondiente. Para tal fin, realizar PCR de colonias aisladas. Si no se observan colonias típicas, realizar un nuevo aislamiento de la zona de cultivo confluente de la cual se obtuvo señal positiva.

16. Determinar el fenotipo enterohemolítico de las colonias presuntivas y/o de los aislamientos *stx* -positivos. (Ver Caracterización de cepas hemolíticas)

- Dado que existe relación entre la producción de Stx y de enterohemolisina (EHEC-Hly), se considera que la detección de EHEC-Hly puede ser un marcador útil para seleccionar rápidamente cepas STEC presuntivas.

17. Confirmar la fermentación de sorbitol en tubo y determinar la actividad de la enzima β-glucuronidasa (β-glu) de los aislamientos. (Ver Procedimiento de Identificación Bioquímica)

- La determinación de la actividad de la enzima β-glucuronidasa es utilizada como marcador bioquímico para diferenciar las cepas de *E. coli* O157, que no presentan actividad β-glu, de otras cepas de *E. coli*.

18. Realizar la biotipificación de las cepas *E. coli* O157 por la fermentación de los azúcares rafinosa, dulcitol y ramnosa. (Ver Procedimiento de Biotipificación)

19. Determinar la movilidad de la cepa aislada utilizando el medio de Craigie. Si la cepa es móvil, se deberá determinar el antígeno flagelar H. (Ver Procedimiento de Serotipificación).

- La detección del antígeno H requiere de una estimulación previa de la movilidad de la cepa mediante varios pasajes en el medio de Craigie. El antígeno H7 puede detectarse por aglutinación en lámina y/o por PCR utilizando oligonucleótidos específicos que amplifican un fragmento del gen *fliCh*7. La técnica de amplificación no requiere de la estimulación previa de la movilidad. (Ver Procedimiento PCR fliCH$_7$)

20. Determinar la sensibilidad de las cepas STEC a los antimicrobianos. (Ver Pruebas de Sensibilidad)
21. Detectar los marcadores de virulencia accesorios de cepas STEC, *eae* y *ehx*A por PCR. (Ver Detección de Factores de Virulencia)
22. Detectar la producción de Stx por ensayos de citotoxicidad específica en células Vero.

- Para la realización de estos ensayos se debe disponer de la línea celular y estufa de CO_2.

2.2- *Identificación Bioquímica*

A los aislamientos presuntivos de STEC se les realizan las siguientes pruebas bioquímicas:

Pruebas Bioquímicas	**Bacteria**			**Medio de cultivo**
	***E. coli* no-O157**	***E. coli* O157:H7**	***E. hermanii***	
Fermentación de glucosa	+	+	+	Agar triple azúcar y hierro (TSI)
Fermentación de lactosa	+	+	+	TSI
Fermentación de sacarosa	+	+	+	TSI
Formación de Ac. Sulfhídrico	-	-	-	TSI
Producción de gas	+	+	+	TSI
Utilización del Citrato	-	-	-	Citrato de Simmons
Producción de indol	+	+	+	Sulfuro, indol, movilidad (SIM)
Movilidad	Móvil / no móvil	Móvil	Móvil	SIM
Fermentación de sorbitol	+	-	-	Fermentación de hidratos de carbono
Actividad β-glucuronidasa	+	-	-	Disco con glucurónido
Actividad lisina ❖decarboxilasa	+ (90) *	+ (100)	- (6%)	Lisina Hierro Agar (LIA)
Actividad ornitina decarboxilasa	+ (95)	+ (100)	+ (100)	Movilidad, indol, ornitina. (MIO)
Fermentación de ❖Celobiosa	- (2%)	- (2%)	+ (97%)	Fermentación de hidratos de carbono
Producción de ❖pigmento amarillo	- (0%)	- (0%)	+ (98%)	Tripticasa de soja

* El dato entre paréntesis indica % de cepas positivas

(+): positivo; (-): negativo

Según Manual of Clinical Microbiology (7° ed). 1999, p. 459.

❖ Estas pruebas bioquímicas son de utilidad para diferenciar *E. coli* O157 y *E. hermanii*.

A los aislamientos presuntivos de EPEC, ETEC, EAEC se les realizan las siguientes pruebas bioquímicas:

Pruebas Bioquímicas	**Categoría EPEC /ETEC/ EAEC**	**Medio de cultivo**
Fermentación de glucosa	+	Agar triple azúcar y hierro (TSI)
Fermentación de lactosa	+	TSI
Fermentación de sacarosa	+	TSI
Formación de H_2S	-	TSI
Producción de gas	+	TSI
Utilización del citrato	-	Citrato de Simmons
Producción de indol	+	Sulfuro, indol, movilidad (SIM)
Movilidad	Móvil / no móvil	SIM
Actividad β-glucuronidasa	+	Disco con glucurónido
Actividad lisina decarboxilasa	+ (90) *	Lisina Hierro Agar (LIA)
Actividad ornitina decarboxilasa	+ (95)	Movilidad, indol, ornitina. (MIO)

* El dato entre paréntesis indica % de cepas positivas. (+): positivo; (-): negativo
Según Manual of Clinical Microbiology (7° ed). 1999, p.. 459.

Las cepas de EIEC en general poseen propiedades bioquímicas, genéticas y patogénicas muy similares a *Shigella* spp. Al igual que este género se presentan como inactivas o poco reactivas principalmente en pruebas fenotípicas como la movilidad, fermentación de la lactosa y actividad lisina decarboxilasa. Se recomienda incorporar en las pruebas bioquímicas, mayor número de ensayos que permitan poner en evidencia la inactividad superior de *Shigella* spp. con respecto a las cepas EIEC, teniendo en cuenta además las característicos diferenciales que presenta *Shigella sonnei* con el resto de las especies. Se citan a continuación algunas de las pruebas que podrían utilizarse para diferenciar las cepas EIEC de *Shigella* spp.

Pruebas Bioquímicas	**Microorganismo**			**Medio de cultivo**
	EIEC	***Shigella* spp**	***Shigella sonnei***	
Fermentación de glucosa	+(100)	+(100)	+(100)	Agar triple azúcar y hierro (TSI)
Fermentación de lactosa	+(25)	-	+(2)	TSI
Fermentación de sacarosa	+(15)	-	+(1)	TSI
Formación de H_2S	-	-	-	TSI
Producción de gas	+(5)	(2)	-	TSI
Utilización del citrato	-	-	-	Citrato de Simmons
Producción de indol	+(80)	+(50)	-	Sulfuro, indol, movilidad (SIM)
Movilidad	+(5)	-	-	SIM
Actividad β-galactosidasa	+(45)	+(2)	+(90)	Disco con o-nitrofenil-β-D-galactósido (ONPG)
Actividad lisina decarboxilasa	+ (40)	-	-	Lisina Hierro Agar (LIA)
Actividad ornitina decarboxilasa	+ (20)	+(1)	+(98)	Movilidad, indol, ornitina. (MIO)
Utilización del acetato	+(40)	+(2)	-	Prueba del acetato
Fermentación D-Sorbitol	+(75)	+(30)	+(2)	Fermentación azúcares
Fermentación de D-Xilosa	+(70)	+(2)	+(2)	Fermentación azúcares
Fermentación de Dulcitol	+(40)	+(2)	-	Fermentación azúcares
Fermentación de Mucato	+(30)	-	+(10)	Fermentación azúcares
Fermentación de salicina	+(10)	-	-	Fermentación azúcares

* El dato entre paréntesis indica % de cepas positivas. (+): positivo; (-): negativo

Según Farmer *et al*. J. Clin. Microbiol. 1985; 21:46-76.

2.2.1- *Fundamento y procedimientos para pruebas bioquímicas*

a) Agar hierro tres azúcares (TSI)

Fundamento:

- Determina la capacidad de un microorganismo de fermentar los hidratos de carbono presentes en el medio de crecimiento básico con producción o no de gas. La fermentación provoca acidificación del medio con viraje del indicador (rojo de fenol) al amarillo.
- Permite detectar la producción del sulfuro de hidrógeno por ennegrecimiento del medio debido a la formación de sulfuro ferroso.

Técnica:

- Inocular la superficie del pico de flauta con estría y el fondo por punción.
- Incubar a 37ºC.
- Efectuar la lectura luego de 18-24 h de incubación.

Interpretación:

Fermentación de azúcares:

Las reacciones que pueden observarse son:

- Pico alcalino (rojo) / fondo alcalino (rojo). No hay fermentación de azúcares.
- Pico alcalino (rojo) / fondo ácido (amarillo). Glucosa fermentada. Lactosa y sacarosa no fermentadas.
- Pico ácido (amarillo) / fondo ácido (amarillo). Glucosa fermentada. Lactosa y/o sacarosa fermentadas.

Producción de gas:

- Se evidencia por la aparición de burbujas o fragmentación del medio.

Sulfuro de hidrógeno:

- Se evidencia por el ennegrecimiento del medio.

b) Utilización de Citrato

Fundamento:

- Determina si un organismo es capaz de utilizar citrato como única fuente de carbono para el metabolismo, produciendo alcalinidad. El medio Citrato de Simmons contiene también sales de amonio inorgánicas. Un organismo que es capaz de utilizar citrato como única fuente de carbono, utiliza también las sales de amonio como única fuente de nitrógeno. Las sales de amonio se desdoblan en amoníaco con la consiguiente alcalinidad. El indicador de pH usado es el azul de bromotimol, el cual en medio alcalino toma un color azul intenso, indicando una prueba positiva. El medio no inoculado tiene color verde.

Técnica:

- Inocular la superficie del pico de flauta con estría y el fondo por punción.
- Incubar a 37ºC durante 48 h (a veces se requiere incubación más prolongada).

Interpretación:

- Prueba positiva: desarrollo de color azul
- Prueba negativa: el medio conserva el color verde original y hay ausencia de desarrollo bacteriano.

c) Utilización del Acetato

Fundamento:

- Determina si un organismo es capaz de utilizar acetato como única fuente de carbono para el metabolismo, produciendo alcalinidad. El medio contiene también sales de amonio inorgánicas. Un organismo que es capaz de utilizar acetato como única fuente de carbono, utiliza también las sales de amonio como única fuente de nitrógeno. Las sales de amonio se desdoblan en amoníaco con la consiguiente alcalinidad. El indicador de pH usado es el azul de bromotimol, el cual en medio alcalino toma un color azul intenso, indicando una prueba positiva. El medio no inoculado tiene color verde.

Técnica:

- Inocular la superficie del pico de flauta con estría y el fondo por punción.
- Incubar a 37ºC durante 48 h (a veces se requiere incubación más prolongada).

Interpretación:

- Prueba positiva: desarrollo de color azul
- Prueba negativa: el medio conserva el color verde original y hay ausencia de desarrollo bacteriano.

d) Sulfuro, indol, movilidad (SIM)

Fundamento:

- Permite detectar la producción del sulfuro de hidrógeno por ennegrecimiento del medio debido a la formación de sulfuro ferroso.
- Permite detectar la producción de indol, producto de la degradación metabólica del aminoácido triptofano. Las bacterias que poseen la enzima triptofanasa son capaces de hidrolizar y desaminar el triptofano con producción de indol, ácido pirúvico y amoníaco. El indol desdoblado de la molécula de triptofano puede ser detectado cuando reacciona con el grupo aldehído del para-dimetilamino benzaldehído del reactivo revelador (reactivo de Kovacs), formándose un complejo de color rojo.

- Determina si el microorganismo es móvil por migración a partir del lugar de siembra y se disemina en el medio provocando turbidez.

Técnica:

- Sembrar por punción única en la región central del tubo, utilizando una aguja recta hasta una profundidad de 2/3 del medio.
- Incubar a 37ºC durante 18-24 h.
- Agregar 2 ó 3 gotas del reactivo de Kovacs para detección del indol.

Interpretación:

Sulfuro de hidrógeno:

- Prueba positiva: Se observa ennegrecimiento del medio.

Indol:

- Prueba positiva: color rojo fucsia en la interfase del reactivo y el medio.
- Prueba negativa: no hay modificación del color en la interfase del reactivo y el medio.

Movilidad:

- Prueba positiva: Se visualiza turbidez parcial o total del medio.
- Prueba negativa: Hay crecimiento bacteriano solamente en la línea de siembra.

e) Movilidad, indol, ornitina (MIO)

Fundamento:

- Determina si el microorganismo es móvil por migración a partir del lugar de siembra y se disemina en el medio provocando turbidez.
- Permite detectar la producción de indol, producto de la degradación metabólica del aminoácido triptofano. Las bacterias que poseen la enzima triptofanasa son capaces de hidrolizar y desaminar el triptofano con producción de indol, ácido pirúvico y amoníaco. El indol desdoblado de la molécula de triptofano puede ser detectado cuando reacciona con el grupo aldehído del para-dimetilamino benzaldehído del reactivo revelador (reactivo de Kovacs), formándose un complejo de color rojo.
- Detecta la capacidad de un microorganismo de decarboxilar la ornitna. Las decarboxilasas son un grupo de enzimas capaces de actuar sobre los grupos carboxilo de los aminoácidos produciendo aminas, de reacción alcalina. Cada una de las decarboxilasas es específica para un aminoácido. La ornitina puede ser decarboxilada transformándose en putrescina. Esto produce un viraje al violeta del indicador púrpura de bromocresol. Como la decarboxilación sólo tiene lugar en medio ácido (pH inferior a 6), es necesario que se produzca previamente la acidificación del medio de cultivo, por fermentación de la glucosa. Por este motivo este medio de cultivo sólo debe utilizarse para la diferenciación de cultivos que fermentan la glucosa. Los microorganismos que no producen ornitina -decarboxilasa pero que son fermentadores de la glucosa, producen un viraje del medio al amarillo. La

incubación por 24 h produce una alcalinización en la superficie del medio de cultivo y consecuentemente un viraje del pico del medio al color violeta.

Técnica:

- Sembrar por punción en el centro del medio de cultivo hasta el fondo del tubo.
- Incubar a 37ºC durante 18-24 h.
- Agregar 2 ó 3 gotas del reactivo de Kovacs para la lectura del indol.

Interpretación:

Movilidad:

- Prueba positiva: Se visualiza turbidez parcial o total del medio.
- Prueba negativa: Hay crecimiento bacteriano solamente en la línea de siembra.

Indol:

- Prueba positiva: color rojo fucsia en la interfase del reactivo y el caldo.
- Prueba negativa: no hay modificación del color en la interfase del reactivo y el caldo.

Ornitina:

- Prueba positiva: Pico violeta / fondo violeta
- Prueba negativa: Pico violeta / fondo amarillo

f) Fermentación de hidratos de carbono (Medio Rojo Fenol)

Fundamento:

- Se produce el viraje del color del indicador si el microorganismo tiene la capacidad de fermentar el hidrato de carbono presente en el medio.

Técnica:

- Sembrar una ansada del aislamiento en 1ml de medio rojo fenol con hidrato de carbono específico al 1%.
- Incubar a 37ºC durante 18-24 h.
- Para todos los azúcares se deben realizar lecturas diarias durante 7 días, con la excepción del sorbitol que se debe efectuar a las 24 h.

Interpretación:

- Prueba positiva: Se observa viraje del indicador al amarillo.

g) Biotipificación de *E. coli* O157:H7

Las cepas de *E. coli* O157:H7 se clasifican en los biotipos A, B, C, D, según la capacidad de fermentar los azúcares rafinosa, dulcitol y ramnosa.

Fundamento:

- Si el microorganismo fermenta el hidrato de carbono presente en el medio, se produce viraje en el color del indicador.

Medios

- Medio para fermentación de azúcares (Medio Rojo Fenol) con rafinosa
- Medio para fermentación de azúcares (Medio Rojo Fenol) con dulcitol
- Medio para fermentación de azúcares (Medio Rojo Fenol) con ramnosa

Materiales y equipamiento

- Ansa de rulo
- Estufa de cultivo a 37ºC

Técnica:

- Seguir procedimiento 2.2.f), Fermentación de hidratos de carbono.(Medio Rojo Fenol), para probar la capacidad de fermentar rafinosa, dulcitol y ramnosa.
- Incubar a 37ºC durante 18-24 h.
- Realizar lecturas diarias durante 7 días.
- Determinar el biotipo del aislamiento según los resultados de la fermentación.

Interpretación:

- Fermentación positiva: Se observa viraje del indicador al amarillo.

El biotipo se establece según la siguiente tabla:

Prueba	**Biotipo *E. coli* O157:H7**			
	A	B	C	D
Rafinosa	+	+	+	+
Dulcitol	-	+	+	-
Ramnosa	-	-	+	+

h) Actividad β-glucuronidasa

Fundamento:

- Se evidencia la formación de un producto cromogénico amarillo por la actividad de la enzima β-glucuronidasa sobre el glucurónido.

Técnica:

- Se realiza una suspensión bacteriana con 0,2 ml de agua destilada estéril (pH 7) y una ansada del aislamiento a identificar.
- Se incorpora un disco impregnado con el glucurónido.
- Se incuba a 37ºC durante 4 h.

Interpretación:

- Prueba positiva: Se observa coloración amarilla por la formación del producto cromogénico.
- Aquellas suspensiones en las cuales no se observa viraje durante las primeras 4 horas se deben incubar durante 2 horas adicionales.

i) Actividad β-galactosidasa

- Se evidencia la formación de un producto cromogénico amarillo por la actividad de la enzima β-galactosidasa sobre el compuesto o-nitrofenil-β-D-galactósido.

Técnica:

- Se realiza una suspensión bacteriana densa con 0,5 ml de solución salina y una ansada del aislamiento a identificar.
- Se incorpora un disco impregnado con el compuesto o-nitrofenil-β-D-galactósido.
- Se incuba a 37ºC, examinar cambio de color hasta 24 h.

Interpretación:

- Prueba positiva: Se observa coloración amarilla por la formación del producto cromogénico.

j) Lisina, Hierro, Agar (LIA)

Fundamento:

- Detecta la capacidad de un microorganismo de decarboxilar la lisina. Las decarboxilasas son un grupo de enzimas capaces de actuar sobre los grupos carboxilo de los aminoácidos produciendo aminas, de reacción alcalina. Cada una de las decarboxilasas es específica para un aminoácido. La lisina puede ser decarboxilada transformándose en cadaverina. Esto produce un viraje del indicador púrpura de bromocresol al violeta. Como la decarboxilación sólo

tiene lugar en medio ácido (pH inferior a 6), es necesario que se produzca previamente la acidificación del medio de cultivo, por fermentación de la glucosa. Por este motivo este medio de cultivo sólo debe utilizarse para la diferenciación de cultivos que fermentan la glucosa. Los microorganismos que no producen lisina decarboxilasa pero que son fermentadores de la glucosa, producen un viraje del medio al amarillo. La incubación de 24 h ocasiona una alcalinización en la superficie del medio de cultivo y consecuentemente un viraje del pico al color violeta. Las cepas *Proteus* y *Providencia*, con excepción de algunas cepas de *Morganella morganii*, desaminan la lisina y producen ácido alfa-ceto-carbónico. Este último, con la sal de hierro y por la influencia de oxígeno forma combinaciones pardo-rojizas en la región superficial del medio de cultivo.

- Permite detectar la producción del sulfuro de hidrógeno por ennegrecimiento del medio debido a la formación de sulfuro ferroso.

Técnica:

- Inocular la superficie del pico de flauta con estría y el fondo por punción.
- Incubar a 37ºC durante 18-24 h.

Interpretación:

Decarboxilación de la lisina:

- Prueba positiva: pico violeta / fondo violeta
- Prueba negativa: pico violeta / fondo amarillo

Desaminación de la lisina:

- Prueba positiva: pico pardo rojizo / fondo amarillo

Sulfuro de hidrógeno:

- Prueba positiva: Se observa ennegrecimiento del medio.

k) Producción de pigmento amarillo

Fundamento:

- Las cepas de *E. hermannii* producen con su desarrollo un pigmento amarillo.

Técnica:

- Cultivar los aislamientos en agar tripticasa de soja a 37 ºC por 18 a 24 h.
- Observar la aparición del pigmento amarillo.
- En ausencia del pigmento dejar incubando a 37ºC y observar el cultivo diariamente por siete días.

2.3.- *Serotipificación*

2.3.1- *Detección del antígeno somático O*

Para la detección del serogrupo se puede efectuar la aglutinación en lámina con antisuero policlonal anti-O o reactivo de látex anti-O.

A) *Aglutinación en lámina con antisuero policlonal anti-*O

Fundamento

Los anticuerpos del antisuero específico aglutinan con la bacteria cuando el antígeno O está presente en el lipopolisacárido (LPS) bacteriano.

Medios

- Antisueros anti-O
- Solución fisiológica estéril (SF)
- Cepa de referencia patrón positivo del antígeno O
- Cepa de referencia patrón negativo del antígeno O
- Tubos testigos de la escala de McFarland

Materiales y equipamiento

- Micropipeta rango 5-40 µl
- Tips para micropipeta
- Lámpara para observar aglutinación
- Lámina de vidrio para aglutinación
- Ansa de rulo

A1) *Aglutinación en lámina con inactivación previa por calor*

Procedimiento	Comentarios
1. Determinar si el aislamiento a ensayar debe ser previamente inactivado por calor, de acuerdo a la composición del antisuero a utilizar.	• El aislamiento a ensayar deberá ser inactivado por calor cuando el antisuero a utilizar haya sido producido con un inóculo cuyo antígeno capsular ha sido previamente eliminado. Mediante el calentamiento a 100ºC se elimina el antígeno capsular de la bacteria quedando expuesto el antígeno O del LPS.
2. Realizar una suspensión en 1 ml de SF	• La turbidez de la suspensión debe

con una ansada de la cepa en estudio.	corresponder al testigo 7 de la escala de McFarland ($BaCl_2$ 0,7 %).
3. Hervir la suspensión durante 1 h.	
4. Colocar, en forma separada, dos gotas de 20 µl de la suspensión en una lámina de vidrio.	
5. Observar las dos suspensiones iluminando la lámina con luz de una lámpara.	• No se debe continuar con el ensayo si la muestra aglutina por si misma. Una muestra autoaglutinada corresponde a una cepa rugosa, la cual puede revertir al estado liso realizando sucesivos pasajes en agar sangre o agar Mueller Hinton.
6. Agregar 15 µl del antisuero a ensayar a una de las dos suspensiones y mezclar.	• La suspensión sin el agregado de antisuero se utiliza como control negativo.
7. Mover la lámina mediante rotación suave durante un minuto.	
8. Observar las suspensiones con luz de una lámpara.	• El ensayo es positivo si solo se observa aglutinación o formación de pequeños grumos en la mezcla de la suspensión bacteriana con el antisuero. El ensayo es negativo si ambas suspensiones son homogéneas sin aglutinación. Si la suspensión de la colonia en estudio presenta aglutinación con un antisuero polivalente se deberá ensayar con los antisueros monovalentes que lo componen.

A2) ***Aglutinación en lámina sin inactivación por calor***

Procedimiento	**Comentarios**
1. Colocar separadamente dos gotas de 20 µl de SF en una lámina de vidrio.	
2. Mezclar una ansada del cultivo con las gotas de SF.	
3. Observar las dos suspensiones iluminando la lámina con luz de una lámpara.	• Si la muestra aglutina por si misma no se debe continuar con el ensayo. Una muestra

4. Agregar 15 µl del antisuero a ensayar a una de las dos suspensiones y mezclar.
5. Mover la lámina mediante rotación suave durante un minuto.
6. Observar la apariencia de las suspensiones con luz de una lámpara.

autoaglutinada corresponde a una cepa rugosa, la cual puede revertir al estado liso realizando sucesivos pasajes en agar sangre o agar Mueller Hinton.

- La suspensión sin el agregado de antisuero se utiliza como control negativo

2.3.2.- ***Detección del antígeno flagelar H***

Se realiza la técnica convencional de aglutinación en tubo, utilizando antisuero anti-H.

Fundamento

Los anticuerpos del antisuero específico aglutinan con el antígeno flagelar correspondiente.

Medios

- Medio de Craigie fraccionado en tubo de ensayo con varilla de vidrio central
- Agar tripticasa de soja (TSA) fraccionado en forma de pico de flauta en tubo de ensayo.
- Antisueros anti-H
- Solución fisiológica (SF) estéril
- Solución fisiológica (SF) formolada 1% (v/v)
- Cepa de referencia patrón positivo del antígeno H
- Cepa de referencia patrón negativo del antígeno H

Materiales y equipamiento

- Estufa de cultivo 37ºC
- Baño termo estatizado 50ºC
- Tubos de hemólisis
- Micropipeta rango 5-40 µl
- Tips para micropipeta
- Lámpara para observar aglutinación
- Lámina de vidrio para aglutinación
- Ansa de rulo
- Ansa de aguja

A) *Prueba y estimulación de la movilidad*

Procedimiento	**Comentarios**
1º Día	
1. Picar con ansa de aguja la colonia en estudio.	
2. Introducir el ansa de aguja en la varilla central del tubo con medio de Craigie.	• Sembrar en el interior de la varilla de vidrio, en el tercio superior del medio de cultivo.
3. Incubar el tubo a 37ºC por 18 h.	• Anotar en el tubo la fecha de la primera siembra
2º Día	
1. Observar el desarrollo de la bacteria y registrar si corresponde al lugar de siembra o alcanzó la superficie del medio de cultivo externo a la varilla.	• La bacteria se considera no móvil cuando su desarrollo corresponde al lugar de siembra después de siete días de incubación a 37ºC. • La bacteria se considera móvil cuando su desarrollo alcanza la superficie del medio de cultivo, externo a la varilla. • Para identificar el antígeno flagelar H se requiere la previa estimulación de la movilidad de la bacteria. Para tal fin, se realizan siete pasajes en el medio de Craigie. Se considera que se ha producido un pasaje, cuando la bacteria desarrolla y alcanza el medio exterior de la varilla en 18 h de incubación a 37ºC.
2. Anotar el Nº del pasaje en la pared del tubo. (Por ejemplo: Pasaje Nº 1)	
3. Picar con el ansa de aguja, la superficie del medio de cultivo desarrollado, en la parte externa a la varilla.	• La bacteria alcanzó su máxima movilidad en la superficie del medio de cultivo.
4. Sembrar con el ansa cargada el interior de la varilla (tercio superior del medio de cultivo) de un tubo con medio de Craigie.	
5. Anotar el Nº de pasaje en la pared del tubo.	
6. Incubar el tubo en estufa a 37ºC por 18 h.	

3º al 7º Día

1. Registrar el desarrollo de la bacteria. Repetir los pasos correspondientes al 2º día hasta completar siete pasajes.
2. Tomar una ansada del tubo correspondiente al 7º pasaje y sembrar en estría de TSA.
3. Incubar el TSA en estufa a 37ºC por 18 h.

- Se debe tomar la ansada de la superficie del medio de cultivo desarrollado externo a la varilla.

8º Día

1. Conservar el cultivo en TSA a 4ºC hasta el procesamiento de identificación del antígeno H.

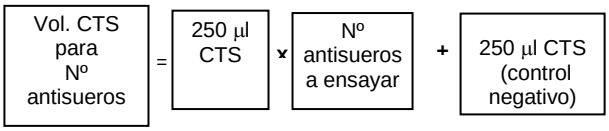
B) ***Identificación del antígeno H: Aglutinación en tubo***

Procedimiento

1. Sembrar una ansada de cultivo de la estría de TSA en caldo CTS.

Comentarios

- En un mismo ensayo se puede enfrentar el cultivo bacteriano con diferentes antisueros anti-H. En estos casos, se debe calcular el volumen de CTS necesario para realizar el ensayo con Nº antisueros:



2. Incubar en estufa a 37ºC con agitación por 8 h.
3. Mezclar el volumen de cultivo-$_{CTS}$, con igual volumen de $SF_{formolada}$ al 1% (v/v).
4. Colocar 500 µl de la mezcla (Cultivo-$_{CTS}$/$SF_{formolada}$) en un tubo de hemólisis. (Tubo de prueba)
5. Agregar 50 µl de antisuero anti-H en el tubo de prueba.
6. Colocar 500 µl de la mezcla (Cultivo-$_{CTS}$/$SF_{formolada}$) en un tubo de hemólisis. (Tubo control).

- Se agrega $SF_{formolada}$ al 1% (v/v) con el fin de inactivar el cultivo desarrollado en CTS.
- Se debe disponer de un número de tubos de prueba igual a la cantidad de antisueros a ensayar.
- En cada tubo de prueba se agrega el antisuero correspondiente.

7. Colocar 50 µl de SF en el tubo control.

- La suspensión sin el agregado de antisuero se utiliza como control negativo. No se debe continuar con el ensayo si la muestra aglutina por si misma. Una muestra autoaglutinada corresponde a una cepa rugosa, la cual puede revertir al estado liso realizando sucesivos pasajes en agar sangre o agar Mueller Hinton.

8. Mezclar e incubar los tubos en baño de agua a 50ºC por 1 h.
9. Observar las dos suspensiones iluminando los tubos con luz de una lámpara.

- Para realizar la lectura se recomienda inclinar suavemente los tubos.
- El ensayo es positivo si solo se observa aglutinación (botón de aglutinación en el fondo del tubo) o formación de pequeños grumos en la mezcla de la suspensión bacteriana con el antisuero (Tubo de prueba). El ensayo es negativo si las suspensiones del tubo de prueba y del tubo control son homogéneas sin aglutinación.
- En cada ensayo se debe realizar el control de los reactivos utilizando cepas patrones positivas y negativas.

2.4.- *Sensibilidad a los antimicrobianos*

Se utiliza el método de difusión en agar por discos (antibiograma) según la técnica de Kirby -Bauer.

Todo el proceso debe responder a las normas establecidas por el Clinical and Laboratory Standards Institute, en lo referente a la siembra en las placas, condiciones de los discos, aplicación de los mismos, incubación, lectura por medición de la zona de inhibición, significado de las colonias que pudieran aparecer dentro de los halos y utilización de cepas patrones.

Medios

- Placas de agar Mueller Hinton (MH) pH 7,2-7,4.
- Discos con antibióticos para amicacina ampicilina, ciprofloxacina colistin, cloranfenicol, gentamicina, ácido nalidíxico, norfloxacina, estreptomicina, tetraciclina y trimetoprima-sulfametoxazol
- Solución fisiológica (SF) estéril
- Cepa patrón ATCC 25922

- Tubos testigos de la Escala de McFarland

Equipamiento

- Hisopo estéril
- Ansa de aguja
- Pinza para discos con antibiótico
- Estufa de cultivo a 37ºC
- Frezzer -20ºC
- Heladera 4ºC
- Calibre para medir halos de inhibición

Procedimiento

1º Día

1. Secar las placas de MH a 37ºC durante 30-60 minutos.
2. Colocar los discos con antibióticos a temperatura ambiente antes de usarlos.
3. Preparar la suspensión bacteriana que se utiliza como inóculo en el antibiograma. Tomar con ansa de aguja colonias aisladas del cultivo a ensayar y resuspender en 2 ml de SF hasta obtener una turbidez correspondiente al testigo 5 ($BaCl_2$ 0,5 %) de la escala de McFarland.
4. Con hisopo estéril previamente embebido con el inóculo y escurrido en las paredes del tubo, estriar las placas de MH en tres direcciones.

Comentario

- Para realizar el antibiograma se debe eliminar la humedad superficial de las placas.
- Se utilizan discos para los siguientes antibióticos: amicacina, ampicilina, ciprofloxacina, colistin, cloranfenicol, gentamicina, ácido nalidíxico, nitrofurantoina, estreptomicina, tetraciclina y trimetoprima-sulfametoxazol
- Los discos deben conservarse en heladera a 4ºC o en freezer a -20ºC.
- Siempre se deben probar cepas patrones paralelamente con los aislamientos en estudio.

5. Dejar estabilizar las placas hisopadas a temperatura ambiente por 5 min.

6. Tomar con pinza y colocar sobre la placa hisopada los discos con antibiótico.
7. Incubar en estufa de cultivo a 37ºC por 18-24 h.

- Colocar 6 discos por placa como máximo.

2º Día

1. Efectuar la lectura de los halos de inhibición, correspondientes a cada disco, con calibre.

- Para la interpretación, los resultados deben cotejarse con las tablas publicadas por CLSI M100-27th, 2017.

2.5.- *Caracterización de cepas hemolíticas*

Fundamento

La composición del agar base triptosa suplementado con Cl_2Ca y glóbulos rojos lavados de sangre desfibrinada de cabra u oveja, permite la visualización de la hemólisis debida a la enterohemolisina de EHEC (EHEC-Hly) después de una incubación a 37ºC por 18 h.

Medios

- Agar tripticasa de soja fraccionado en forma de pico de flauta en tubo de ensayo (TSA)
- Agar base triptosa con glóbulos rojos lavados (AGRL)
- Agar base triptosa con glóbulos rojos sin lavar (AGRSL)

Materiales y Equipamiento

- Estufa de cultivo a 37ºC
- Ansa de rulo
- Cepa control positivo: *E. coli* 32511 O157:H-
- Cepa control negativo: *E. coli* ATCC 25922 sin factores de virulencia

Procedimiento | **Comentarios**

1º Día

1. Sembrar colonias presuntivas y cepas controles en TSA
2. Incubar los tubos en estufa de cultivo a

37ºC por 18 h.

3. Preparar placas AGRL y AGRSL

- Ver preparación de las placas de AGRL y AGRSL.

2º Día

1. A partir del cultivo en TSA, sembrar con ansa de rulo las placas de AGRL (placa de ensayo) y AGRSL (placa control).

- En cada placa se pueden probar varias cepas presuntivas. Siempre se deben sembrar las cepas controles positivo y negativo. Se sugiere dividir las placas dibujando una grilla con espacios no menores de 2 $cm^{2.}$

2. Incubar ambas placas a 37 ºC por 3 h.
3. Realizar una primera lectura de ambas placas a las 3 h de incubación, observando si hay fina hemólisis alrededor del desarrollo bacteriano.

- El aislamiento se considera no productor de EHEC-Hly si después de 3 h de incubación se observa hemólisis por α-hemolisina (α-Hly) en placa control (AGRSL) y o en placa de ensayo (AGRL). Si no se observa hemólisis continuar con la incubación.

4. Continuar la incubación de las placas a 37 ºC hasta cumplimentar las 18 h.

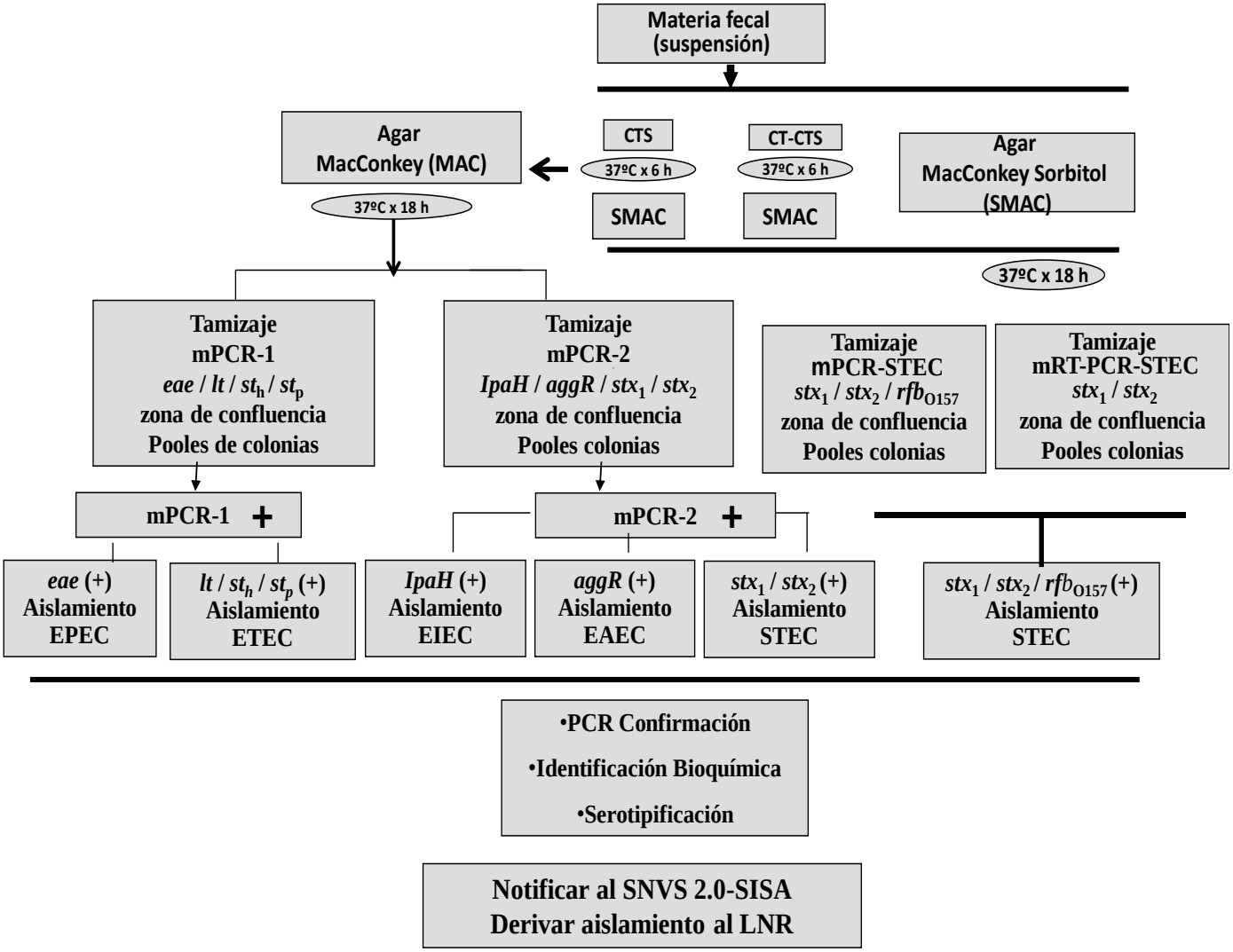
3º Día

Realizar una segunda lectura de las placas.

- La cepa es productora de EHEC-Hly si después de 18 h de incubación aparece una fina hemólisis alrededor de la zona de siembra solo en la placa de ensayo (AGRL).

  Si después de 18 h de incubación también se observa hemólisis en ambas placas (AGRL y AGRSL), la cepa es productora de α-Hly y no de EHEC-Hly. Se puede visualizar mejor la hemólisis dejando la placa a 4ºC por 2 h o bien levantando suavemente el desarrollo bacteriano con un ansa.

Algoritmo para el diagnóstico y caracterización de *Escherichia coli* diarreigénico STEC, EPEC, ETEC, EIEC y EAEC



- PCR Confirmación
- Identificación Bioquímica
- Serotipificación

Notificar al SNVS 2.0-SISA
Derivar aislamiento al LNR

CAPÍTULO III - DETECCIÓN DE FACTORES DE VIRULENCIA

1.- *Detección genotípica de los factores de virulencia por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa* (PCR) *en tiempo final.*

Fundamento de la Técnica de PCR

Esta técnica se fundamenta en la propiedad natural de las enzimas ADN polimerasas para replicar cadenas simples de ADN. La replicación enzimática de una molécula blanco o templado de ADN, mediante ciclos repetitivos de amplificación, permite obtener un producto fácilmente detectable. En PCR de punto final el producto de amplificación se detecta en un gel de agarosa realizando una electroforesis convencial.

Equipamiento

- Termociclador para PCR
- Micropipeta para reactivos de PCR rango: 0,5 - 10 µl
- Micropipeta para reactivos de PCR rango: 5 - 40 µl
- Micropipeta para reactivos de PCR rango: 40 - 200 µl
- Micropipeta para el templado de ADN rango: 0,5 - 10 µl
- Micropipeta para amplicones: 5- 40 µl
- Baño de agua para hervir
- Microcentrifuga para tubos Eppendorf
- Cuba y fuente de poder para electroforesis
- Transiluminador UV
- Freezer -20ºC
- Heladera 4ºC

Materiales

- Ansa de aguja
- Tubos Eppendorf 1,5 ml
- Microtubos pared delgada PCR 0,2 ml
- Tips con filtro para aerosoles
- Recipiente con hielo

Reactivos

- Buffer Titrón X-100 al 1% en buffer TE 1X
- Buffer PCR10X
- Mezcla de dNTPs: dATP, dCTP, dGTP, y dTTP: 2,5 mM
- Cl_2Mg 25 ó 50 Mm

- Par de primers específicos: 0,1 nmol/µl
- Taq polimerasa: 5U/µl
- Agua tridestilada estéril (H_2O ddd)
- Aceite mineral
- Agarosa
- Buffer TAE 1X
- Bromuro de Etidio (BrEt): 10 mg/ml
- Buffer de siembra 1: Xilenecianol 0,05%, glicerol en agua 30%
- Buffer de siembra 2: Azul de Bromofenol 0,25%, glicerol en agua 30%
- Marcador de tamaño molecular: 100 pb
- Marcador de tamaño molecular: 1 kb

a) **Preparación de la muestra**

Procedimiento	**Comentarios**
1. Tomar una ansada de cultivo correspondiente a la zona de crecimiento confluente de las placas de cultivo.	• La técnica de PCR es de muy alta sensibilidad. Se recomienda establecer diferentes áreas de trabajo para evitar la obtención de falsos resultados positivos por contaminaciones cruzadas: **1.** Área de procesamiento de la muestra y obtención del ADN. (Ver FIGURA 1A) **2.** Área de preparación de la mezcla de reacción. (Ver FIGURA 1B) **3.** Área para el agregado del templado y amplificación. (Ver FIGURA 1C) **4.** Área de detección de los productos de amplificación. (Ver FIGURA 1D)
2. Resuspender la muestra en 150 µl de buffer Titrón X-100 al 1% en buffer TE 1X.	• Fraccionar el buffer Titrón en tubos Eppendorf de 1,5 ml de capacidad, en el área de preparación de la mezcla de reacción. Utilizar micropipeta para uso exclusivo de reactivos, y tips con filtro para aerosoles. Luego trasladar los tubos al área de procesamiento de la muestra para preparar el extracto de ADN. • Frotar el ansa cargada de muestra contra las paredes del tubo con buffer Titrón.

3. Seleccionar 5 colonias presuntivas con igual morfología, de las placas de cultivo.
4. Picar las colonias con ansa de aguja y resuspenderlas en 150 µl de Buffer Titrón X-100 al 1% en buffer TE 1X.
   - Frotar el ansa contra las paredes del tubo.
5. Preparar el extracto de ADN de las cepas de referencia que serán utilizadas como controles (positivo y negativo) en la reacción. Seguir los pasos 3, 4, y 8
   - Verificar las cepas de referencia que se utilizan en cada protocolo de PCR.
6. Hervir en baño de agua a 100ºC durante 15 minutos
   - El efecto conjunto del detergente Titrón y el calentamiento produce la lisis bacteriana y la liberación del ADN.
   - Tomar la precaución de cerrar bien los tubos Eppendorf antes de hervir.
7. Centrifugar a 10.000 rpm durante 5 minutos.
   - Luego de la centrifugación, se obtiene un pellet correspondiente al debris bacteriano y un sobrenadante donde se encuentra el ADN.
8. Conservar el extracto de ADN a 4ºC para ser utilizado como templado en la reacción de PCR.
   - El extracto de ADN puede conservarse en freezer a -20ºC para ser utilizado en otra PCR. Conservarlos en un área libre de reactivos.
   - Si el extracto es descongelado, es necesario realizar una centrifugación a 10.000 rpm por 5 minutos antes de utilizarlo.

b) **Preparación de la mezcla de reacción**

Procedimiento

1. Retirar los reactivos para la PCR del freezer de -20ºC. Esperar que los mismos se descongelen y colocarlos en un recipiente con hielo.
   - Los reactivos para PCR deben conservarse en freezer a -20ºC en un área específica para tal fin.
2. Establecer el número de determinaciones y completar el protocolo de la PCR a realizar (Ver Protocolo específico)
   - Realizar el siguiente cálculo para determinar el número de determinaciones:

$$\text{Nº de determinaciones} = \text{Nº de muestras presuntivas} + \text{Control Positivo} + \text{Control Negativo} + \text{Control Reactivos} + 1$$

   - Se suma 1 para calcular, en exceso, el volumen total de la mezcla de reacción. Se contempla de esta manera los probables errores de pipeteo que pueda

cometer el operador.

3. Para cada reactivo, calcular los volúmenes necesarios en la mezcla de reacción, de acuerdo al número de determinaciones

- Las concentraciones de los reactivos de trabajo, de los reactivos en la mezcla y los volúmenes de los reactivos para una determinación, se indican en el protocolo específico de cada PCR.
- Realizar el siguiente cálculo para determinar el volumen de cada reactivo en la mezcla:

Vol. del Rvo. en la mezcla para n determinaciones	=	Vol. del Rvo. en la mezcla para una determinación	X	Nº de determinaciones

4. Enumerar los microtubos de 0,2 µl de acuerdo al Nº de muestras.
5. Preparar la mezcla en un tubo Eppendorf de 1,5 ml. agregando los reactivos en el siguiente orden:
    a. H_2O ddd
    b. Buffer PCR
    c. dNTPs
    d. Cl_2Mg
    e. Primers
    f. Taq polimerasa
6. Resuspender la mezcla con micropipeta y fraccionar 48 µl en cada microtubo de PCR.
7. Cerrar y trasladar los microtubos de PCR al área de carga de los templados y donde se encuentra el termociclador.

- Marcar la pared del tubo utilizando una fibra indeleble.
- Preparar la mezcla en un área o superficie libre de bacterias, muestras de ADN o productos amplificados.
- Utilizar micropipetas exclusivas para reactivos de PCR y tips con filtro para aerosoles.
- Homogenizar los reactivos antes de usarlos.
- La enzima debe permanecer siempre a -20ºC para evitar que baje su actividad.
- En el momento que deba ser utilizada, retirarla del freezer y colocarla rápidamente en un bloque frío.
- Descartar el resto de volumen que queda en el tubo de 1,5 ml. Este sobrante, corresponde al volumen de muestra para una determinación calculado previamente en exceso.

c) **Carga de los templados y amplificación**

Procedimiento

1. Agregar a cada microtubo, 2 µl del templado correspondiente. Al microtubo de control de reactivos se agrega 2 µl de H_2O ddd.

Comentarios

- Para cargar los templados se debe utilizar una micropipeta exclusiva para manipulear ADN y tips con filtro para aerosoles.
- El volumen del templado se toma del sobrenadante del tubo donde se prepara el extracto de ADN.

2. Agregar una gota de aceite mineral a cada microtubo.

- Se agrega aceite mineral para evitar que la mezcla de reacción se evapore cuando es sometida a las diferentes temperaturas del programa de amplificación. No es necesario el agregado de aceite mineral cuando se dispone de un termociclador con tapa aseguradora de tubos.

3. Colocar los microtubos en el termociclador y activar el programa de amplificación específico para cada PCR. (Ver Protocolo PCR)

- Tomar la precaución de cerrar correctamente los microtubos.

d) **Detección del producto de amplificación**

Procedimiento

1. Preparar un gel de agarosa en buffer TAE 1X. (Ver en el protocolo de cada PCR que porcentaje de agarosa se utiliza para preparar el gel)

Comentarios

- Se deberá preparar un gel de una consistencia tal, que permita separar y visualizar correctamente las bandas después de realizar la corrida electroforética. La concentración de agarosa a utilizar depende del tamaño de la banda del producto amplificado.
- Armar la bandeja o el molde para el gel de agarosa.
- Colocar el peine o molde para hoyos.
- Disolver la agarosa en buffer TAE 1X en microondas ó en baño de agua caliente.
- Dispensar BrEt hasta una concentración final de 0,5 μg/ml. Agregar antes que gelifique el gel y mezclar para homogenizar. El BrEt es agregado al gel para poder visualizar el ADN.

  Esta droga es potencialmente tóxica por sus propiedades mutagénicas. Se recomienda utilizar guantes para su manipulación.
- Se puede utilizar el colorante Sybr Safe como otra alternativa para visualizar el ADN. Agregar 10ul de sybr safe 10000X por 100 ml de solución de agarosa.
- Dejar gelificar y retirar el peine del gel.
- Colocar el molde con el gel en la cuba

electroforética. La molécula de ADN tiene carga negativa y en la corrida electroforética migra hacia el polo positivo de la cuba. Por lo tanto orientar el gel de manera que la zona de siembra quede conectada al borne negativo.

- Cubrir con buffer TAE 1X. El buffer debe penetrar en los hoyos y sobrepasar la superficie del gel en 0,5 cm.

2. Retirar los microtubos del termociclador y llevar al área de detección del producto de amplificación.
3. Diluir los amplificados en buffer de siembra 1.

- El buffer de siembra 1 está compuesto por Xilenecianol (0,05%) y glicerol en agua 30%).
- El glicerol arrastra al ADN hacia el fondo del hoyo y el colorante Xilene marca el fondo de corrida.
- Se debe diluir una parte del buffer de siembra 1 (6X) en 5 partes del amplificado.
- Otra alternativa de visualización de la corrida y del ADN es utilizar el colorante Gel red en el buffer de siembra. Realizar una 1° dilución 1/70 del GelRed 10000X en agua tridestilada y luego una 2° dilución al medio en buffer de siembra 1 (6X). Para sembrar el amplificado en el gel, se debe diluir una parte del buffer de siembra-GelRed en 5 partes del amplificado. En el gel ya solidificado sembrar en cada hoyo 10 µl de esta última dilución.

4. Sembrar los amplificados en el gel.

- Utilizar una micropipeta de uso exclusivo para la siembra de geles.

5. Sembrar paralelamente un marcador de tamaño molecular diluido en buffer de siembra 2. (Ver el marcador de tamaño molecular que es sugerido en cada protocolo de PCR).

- La elección del marcador de tamaño molecular dependerá del tamaño del fragmento a amplificar. El marcador adecuado es aquel que permite establecer si la banda obtenida para cada producto amplificado, es del tamaño esperado.
- El buffer de siembra 2 esta compuesto por Azul de Bromofenol 0,25% y glicerol en agua 30%.

- El colorante Azul de Bromofenol marca el frente de corrida. Se debe diluir una parte del buffer de siembra 2 (6X) en 5 partes del marcador.

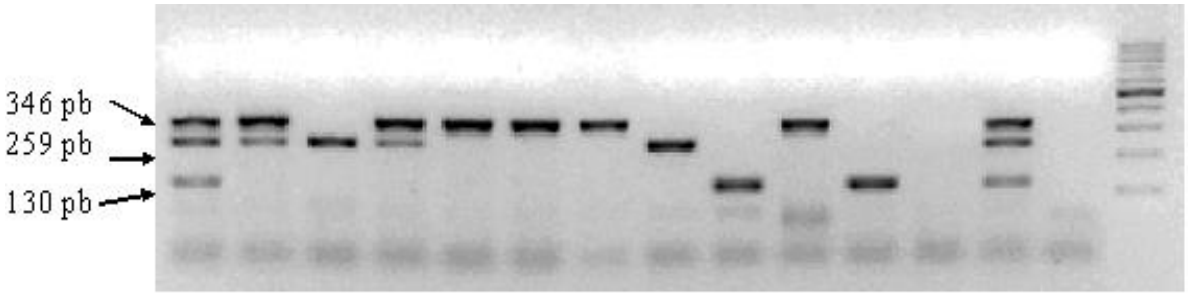
6. Conectar la cuba a la fuente de poder.
7. Realizar la corrida electroforética a 90 Volts por 40 minutos.
8. Colocar el gel en el UV-transiluminador

- Una exposición inadecuada a luz ultravioleta puede dañar la piel y los ojos. Se recomienda usar anteojos protectores de UV.
- Observar en la calle del control positivo, la presencia de bandas específicas cuyo tamaño corresponde al fragmento amplificado. No se deben visualizar bandas en las calles del control negativo y del control de reactivos.
- Observar y registrar en el protocolo, la presencia de bandas específicas en las calles correspondientes a las muestras presuntivas.
- En el caso de haber utilizado BrEt para la visualización del ADN, descartar el gel de agarosa siguiendo las normas para la eliminación de residuos tóxicos.

1.1.- PCR múltiple *stx*1 / *stx*2 / *rfb*O157

Se utilizan los oligonucleótidos o "primers" iniciadores de Pollard et al., que amplifican un fragmento de 130 pb de la región del gen correspondiente a la subunidad B para Stx1 y un fragmento de 346 pb de la región del gen correspondiente a la subunidad A para Stx2 y los oligonucleótidos iniciadores de Paton et al, que amplifican un fragmento de 259 pb del gen *rfb* correspondiente al LPS O157.

Primer	Secuencia del primer (5'-3')	Tamaño del fragmento de amplificación (pb)
stx1a	GAAGAGTCCGTGGGATTACG	130
stx1b	AGCGATGCAGCTATTAATAA	
stx2a	TTAACCACACCCCACCGGGCAGT	346
stx2b	GCTCTGGATGCATCTCTGGT	
O157F	CGGACATCCATGTGATATGG	259
O157R	TTGCCTATGTACAGCTAATCC	



Productos de amplificación por PCR para la detección de los genes *stx*1, *stx*2 y *rfb*O157 en cepas de referencia y en cepas STEC de distinto origen. Líneas 1 y 13: control positivo *E. coli* EDL933 *stx*1/*stx*2/*rfb*O157+. Líneas 2 y 4: *E. coli* O157:H7 *stx*2/*rfb*O157+, aislados de casos de SUH. Líneas 3 y 8: *E. coli* O157 *rfb*O157+, aislados de alimentos. Líneas 5, 6, 7 y 10: *E. coli stx*2+, aislados de casos de diarrea. Lineas 9 y 11: *E. coli stx*1+, aislados de casos de diarrea. Línea 12: control negativo *E. coli* ATCC 25922 sin factores de virulencia. Linea 14-: control de reactivos (mezcla sin templado). Línea 15: marcador de tamaño molecular Cien Marker.

Referencias

- 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; 28:540-5
- Paton A, Paton J. Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using Multiplex PCR assays for *stx*1, *stx*2, *eae*A, enterohemorrhagic *E. coli hly*A, *rfb*O111, and *rfb*O157. J. Clin. Microbiol. 1998; 36:598-602.
- Leotta GA, Chinen I, Epszteyn S, Miliwebsky E, Melamed IC, Motter M, Ferrer M, Marey E, Rivas M. Validation de una técnica de PCR multiple para la detección de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga. Rev. Arg. de Microbiol. 2005; 37:1-10.

1.1.1.-Protocolo PCR múltiple *stx*1 / *stx*2 / *rfb*O157

Cepas de referencia	Control
E. coli FP110/05, O157:H7 Stx1/Stx2	Positivo
E. coli ATCC 25922 sin factores de virulencia	Negativo

Programa de amplificación

Paso Nº	Etapa	Temperatura ºC	Tiempo	Va al paso Nº	Nº veces
1	Desnaturalización	94	5 min		
2	Desnaturalización	94	30 seg		
3	Pegado de primers ó Annealing	58	30 seg		
4	Extensión	72	30 seg	2	29
5	Extensión	72	2 min		
6	Pausa	4			

Características del gel	Marcador de peso molecular
Agarosa al 2% en buffer TAE 1X	100 pb

Tamaño de los fragmentos

Primers	Tamaño del Fragmento (pb)
stx1a / stx1b	130
stx2a / stx2b	346
O157F / O157R	259

Protocolo PCR múltiple *stx*1 / *stx*2 / *rfb*O157 **Fecha:**

Reactivo	Concentración de trabajo del reactivo	Concentración del reactivo en la mezcla	Volumen del reactivo en la mezcla para una determinación (µl)	Volumen del reactivo en la mezcla para Nº determinaciones (µl)
Buffer	10X	1X	5	
Mezcla dNTP	2,5 mM	0,1 mM	2	
Cl_2Mg	25 mM*	1,5 mM	3	
Primer stx1a	0,1 nmol/µl	2 pmol/□l	1	
Primer stx1b	0,1 nmol/µl	2 pmol/□l	1	
Primer stx2a	0,1 nmol/µl	0,4 pmol/□l	0,2	
Primer stx2b	0,1 nmol/µl	0,4 pmol/□l	0,2	
Primer O157F	0,1 nmol/µl	0,8 pmol/□l	0,4	
Primer O157R	0,1 nmol/µl	0,8 pmol/□l	0,4	
Taq polimerasa	5 U/µl	0,02 U/□l	0,2	
Templado			2	
H_2O ddd			34,6	
Vol. Final			50	

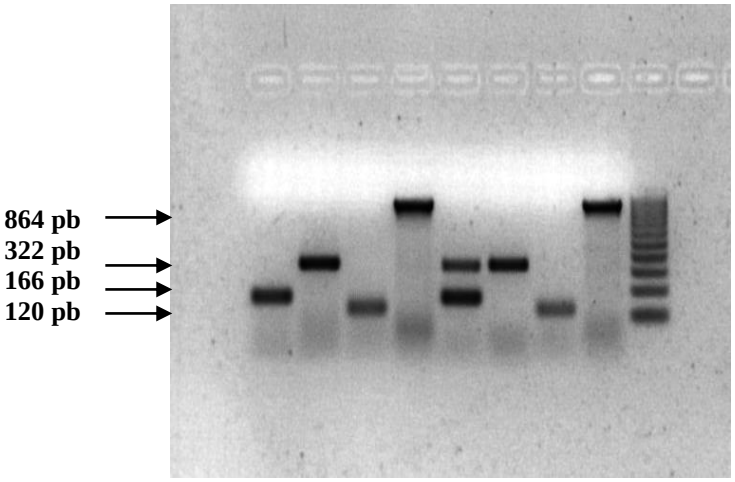
* La concentración del Cl_2Mg puede variar según la marca comercial del equipo de la Taq polimerasa. En general se comercializa el Cl_2Mg a 25 ó 50 mM. Si se dispone la concentración de 50 mM, se utiliza 1,5 µl de Cl_2Mg y 36,1 µl de H_2O ddd por determinación.

Microtubo Nº	Identificación de la muestra	Colonia Nº	Resultado
1	#1		
2	#2		
3	#3		
4	#4		
5	#5		
6	#6		
7	#7		
8	#8		
9	Control positivo FP110/05		
10	Control negativo ATCC 25922		
N	Control reactivos		

1.2.- PCR múltiple *eae* / *lt* / *st*h / *st*p

Se utilizan los oligonucleótidos o "primers" iniciadores de: I) Karch et al., que amplifican un fragmento de 864 pb de la región conservada del gen *eae* para EPEC y de EHEC; II) Tamanai-Shacoori et al., que amplifican un fragmento de 322 pb de la región del gen correspondiente a la subunidad B para la toxina LT de ETEC; y III) Rodas et al., que amplifican un fragmento de 120 pb correspondiente al gen de la toxina STh de ETEC; y IV) Woodward et al., que amplifican un fragmento de 166 pb correspondiente al gen de la toxina STp de ETEC.

Primer	Secuencia del primer (5'-3')	Tamaño del fragmento de amplificación (pb)
SK1	CCCGAATTCGGCACAAGCATAAGC	864
SK2	CCGGATCCGTCTCGCCAGTATTCG	
LT-L	TCTCTATGTGCATACGGAGC	322
LT-R	CCATACTGATTGCCGCAAT	
STh-f	TTCACCTTTCCCTCAGGATG	120
STh-r	CTATTCATGCTTTCAGGACCA	
STp-f	TCTTTCCCCTCTTTTAGTCAG	166
STp-r	ACAGGCAGGATTACAACAAAG	



Productos de amplificación por PCR para la detección de los genes *eae, lt* y *st* en cepas de referencia y en cepas aisladas de casos clínicos. Líneas 1: *E. coli st*p+ aislado de un caso de diarrea. Línea 2: *E.coli lt*+ aislado de un caso de diarrea. Línea 3: *E. coli stp*h+ aislado de un caso de diarrea. Línea 4: *E. coli* O26:H11 *eae*+ aislado de un caso de diarrea. Línea 5: control positivo *E. coli* KNH-172 *lt* y *st*p +. Línea 6: control positivo *E. coli* EBA-35 lt+. Línea 7: control positivo *E. coli* 126-53 *st*h. Línea 8: control positivo *E. coli* 2348/69 *eae*+. Línea 7: marcador de tamaño molecular Cien Marker.

Referencias

- Karch H, Bohm 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: 1200-5.
- Tamanai-Shacoori Z, Jolivet-Gougeon A, Pommpuy M, Cormier M, Colwell RR. Detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* in water by polymerase chain reaction amplification and hybridation. Can. J. Microbiol. 1994; 40: 243-9.
- Rodas C, Iniguez V, Qadri F, Wiklund G, Svennerholm AM, Sjöling A. Development of multiplex PCR assays for detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* colonization factors and toxins. J Clin. Microbiol. 2009; 47: 1218-20.
- Woodward MJ, Carroll PJ, Wray C. Detection of entero-and verocyto-toxin genes in *Escherichia coli* from diarrhoeal discase in animals using the polymerase chain reaction. Vet. Microbiol. 31: 251-61.

1.2.1.-Protocolo PCR múltiple *eae* / *lt* / *st*h / *st*p

Cepas de referencia	Control
E. coli 2348/69 *eae* (EPEC)	Positivo
E. coli KNH-172 *lt* / *st*p (ETEC)	Positivo
E. coli O126-53 *st*h (ETEC)	Positivo
E. coli EBA-35 *lt* (ETEC)	Positivo
E. coli ATCC 25922 sin factores de virulencia	Negativo

Programa de amplificación

Paso Nº	Etapa	Temperatura ºC	Tiempo	Va al paso Nº	Nº veces
1	Desnaturalización	94	5 min		
2	Desnaturalización	94	30 seg		
3	Pegado de primers ó Annealing	56	1 min		
4	Extensión	72	1 min	2	29
5	Extensión	72	2 min		
6	Pausa	4			

Características del gel	Marcador de peso molecular
Agarosa al 2% en buffer TAE 1X	100 pb

Tamaño de los fragmentos

Primers	Tamaño del Fragmento (pb)
Sk1 / Sk2	864
LT-L / LT-R	322
STh-f / STh-r	120
STp-f / STp-r	166

Protocolo PCR múltiple *eae* / *lt* / *sth* / *stp* **Fecha:**

Reactivo	Concentración de trabajo del reactivo	Concentración del reactivo en la mezcla	Volumen del reactivo en la mezcla para una determinación (µl)	Volumen del reactivo en la mezcla para Nº determinaciones (µl)
Buffer	10X	1X	5	
Mezcla dNTP	2,5 mM	0,1 mM	2	
Cl_2Mg	25 mM	1.5 mM	3	
SK1	0,1 nmol/µl	0,2 pmol/□l	0,1	
SK2	0,1 nmol/µl	0,2 pmol/□l	0,1	
LT-R	0,1 nmol/µl	0,25 pmol/□l	0,125	
LT-F	0,1 nmol/µl	0,25 pmol/□l	0,125	
STh-f	0,1 nmol/µl	0,2 pmol/□l	0,1	
STh-r	0,1 nmol/µl	0,2 pmol/□l	0,1	
STp-f	0,1 nmol/µl	0,2 pmol/□l	0,1	
STp-r	0,1 nmol/µl	0,2 pmol/□l	0,1	
Taq polimerasa	5 U/µl	0,03 U/□l	0,3	
Templado			2	
H_2O ddd			36,85	
Vol. Final			50	

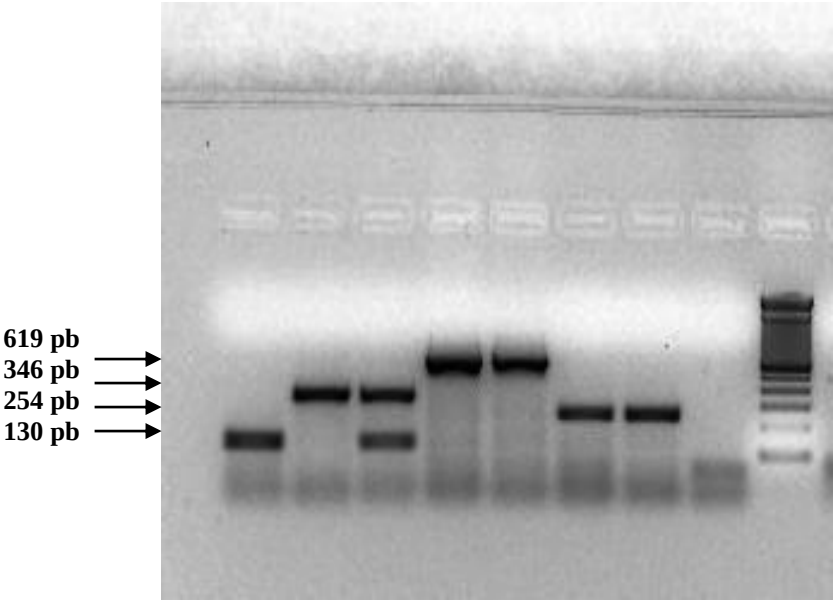
* La concentración del Cl_2Mg puede variar según la marca comercial del equipo de la Taq polimerasa. En general se comercializa el Cl_2Mg a 25 ó 50 mM. Si se dispone la concentración de 50 mM, se utiliza 1,5 µl de Cl_2Mg y 38,35 µl de H_2O ddd por determinación.

Microtubo Nº	Identificación de la muestra	Colonia Nº	Resultado
1	#1		
2	#2		
3	#3		
4	#4		
5	#5		
6	#6		
7	Control positivo 2348/69		
8	Control positivo KNH-17		
9	Control positivo O126-53		
10	Control positivo EBA-35		
11	Control negativo ATCC 25922		
N	Control reactivos		

1.3.- PCR múltiple *Ipa*H / *aggR* / *stx*1 / *stx*2

Se utilizan los "primers" iniciadores de: I) Sethabutr et al., que amplifican un fragmento de 619 pb de la región del gen correspondiente a la secuencia IpaH de EIEC y de *Shigella* spp. II) Ratchtrachenchai et al., que amplifican un fragmento 254 pb de la región del gen correspondiente al regulador de expresión AggR de EAEC III) Pollard et al., que amplifican un fragmento de 130 pb de la región del gen correspondiente a la subunidad B para Stx1 y un fragmento de 346 pb de la región del gen correspondiente a la subunidad A para Stx2.

Primer	Secuencia del primer (5'-3')	Tamaño del fragmento de amplificación (pb)
IpaH8B	GTTCCTTGACCGCCTTTCCGA	619
IpaH15B	GCCGGTCAGCCACCCTCTGAG	
aggRks1	GTATACACAAAAGAAGGAAGC	254
aggRkas2	ACAGAATCGTCAGCATCAGC	
stx1a	GAAGAGTCCGTGGGATTACG	130
stx1b	AGCGATGCAGCTATTAATAA	
stx2a	TTAACCACACCCCACCGGGCAGT	346
stx2b	GCTCTGGATGCATCTCTGGT	



Productos de amplificación por PCR para la detección de los genes *IpaH, aggR, stx1 y stx2* en cepas de referencia y en cepas aisladas de casos clínicos. Líneas 1y 2: *E. coli* O103:H2 *stx*1+ y *E. coli* O145:NM *stx*2 aislados de casos de diarrea. Línea 3: control positivo *E. coli* O157:H7 *stx*1/ *stx*2 +. Línea 4: *E. coli* O124 *IpaH*+. Línea 5: control positivo *E. coli* C-481 *IpaH*+. Línea 6: *E. coli* O128 *aggR*+ aislado de un caso de diarrea. Línea 7: control positivo *E. coli* 17-2 *aggR*+. Línea 8: control negativo *E. coli* ATCC 25922 sin factores de virulencia. Línea 9: marcador de tamaño molecular Cien Marker.

Referencias

- Scethabutr 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: 265-9.
- Ratchtrachenchai OA, Subpasu S, Ito K. Investigation on enteroaggregative *Escherichia coli* infection by multiplex PCR. Bull. Dep. Med. Sci. 1997.39: 211-20.
- 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; 28:540-5

1.3.1.-Protocolo PCR múltiple *Ipa*H / *aggR* / *stx*1 / *stx*2

Cepas de referencia	Control
E. coli C-481 *ipaH* (EIEC)	Positivo
E. coli 17-2 *aggR* (EAggEC)	Positivo
E. coli 110/05 *stx*1 / *stx*2 (STEC)	Positivo
E. coli ATCC 25922 sin factores de virulencia	Negativo

Programa de Amplificación

Paso Nº	Etapa	Temperatura ºC	Tiempo	Va al paso Nº	Nº veces
1	Desnaturalización	94	5 min		
2	Desnaturalización	94	30 seg		
3	Pegado de primers ó annealing	57	1 min		
4	Extensión	72	30 seg	2	29
5	Extensión	72	2 min		
6	Pausa	4			

Características del gel	Marcador de peso molecular
Agarosa al 2% en buffer TAE 1X	100 pb

Tamaño del fragmento

Primers	Tamaño del Fragmento (pb)
IpaH8B / IpaH15B	619
aggRks1 / aggRkas2	254
*stx*1a / *stx*1b	130
stx2a / stx2b	346

Protocolo PCR múltiple *IpaH / aggR / stx1 / stx2* **Fecha:**

Reactivo	Concentración de trabajo del reactivo	Concentración del reactivo en la mezcla	Volumen del reactivo en la mezcla para una determinación (µl)	Volumen del reactivo en la mezcla para Nº determinaciones (µl)
Buffer	10X	1X	5	
Mezcla dNTP	2,5 mM	0,1 mM	2	
Cl_2Mg	25 mM	0,75 mM	1,5	
IpaH8	0,1 nmol/µl	0,25 pmol/□l	0,125	
IpaH15	0,1 nmol/µl	0,25 pmol/□l	0,125	
aggRks1	0,1 nmol/µl	1 pmol/□l	0,5	
aggRkas2	0,1 nmol/µl	1 pmol/□l	0,5	
Stx1 F	0,1 nmol/µl	1,6 pmol/□l	0,8	
Stx1 R	0,1 nmol/µl	1,6 pmol/□l	0,8	
Stx2 F	0,1 nmol/µl	0,4 pmol/□l	0,2	
Stx2 R	0,1 nmol/µl	0,4 pmol/□l	0,2	
Taq polimerasa	5 U/µl	0,03 U/□l	0,3	
Templado			2	
H2O ddd			35,95	
Vol. Final			50	

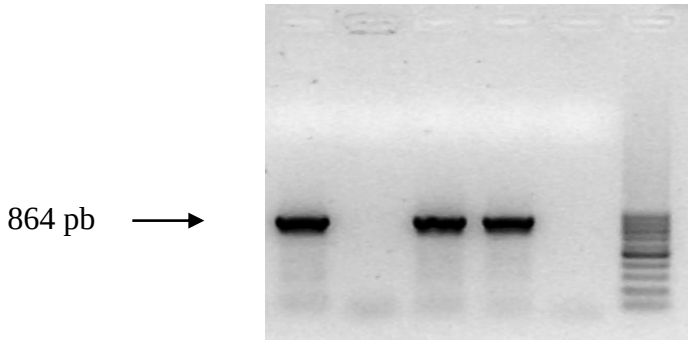
* La concentración del Cl_2Mg puede variar según la marca comercial del equipo de la Taq polimerasa. En general se comercializa el Cl_2Mg a 25 ó 50 mM. Si se dispone la concentración de 50 mM, se utiliza 0,75 µl de Cl_2Mg y 36,7 µl de H_2O ddd por determinación.

Microtubo Nº	Identificación de la muestra	Colonia Nº	Resultado
1	#1		
2	#2		
3	#3		
4	#4		
5	#5		
6	Control positivo C-481		
7	Control positivo 17-2		
8	Control positivo 110/05		
9	Control negativo ATCC 25922		
N	Control reactivos		

1.4.- PCR factor *eae*

Se utilizan los "primers" iniciadores de Karch et al., que amplifican un fragmento de 864 pb de la región conservada del gen *eae* para EPEC y de EHEC.

Primer	Secuencia del primer (5'-3')	Tamaño del fragmento de amplificación (pb)
SK1	CCCGAATTCGGCACAAGCATAAGC	864
SK2	CCGGATCCGTCTCGCCAGTATTCG	



Productos de amplificación por PCR para la detección del gen *eae* en cepas de referencia y en una cepa de STEC de origen clínico. Línea 1: *E. coli* O145:NM Stx2 / *eae*+, aislado de un caso de SUH. Línea 2: control negativo *E. coli* ATCC 25922 sin factores de virulencia. Líneas 3 y 4: controles positivos *E. coli* 2348/68 *eae*+ (EPEC) y *E. coli* E32511 *eae*+ (STEC). Línea 5: control de reactivos (mezcla sin templado). Línea 6: marcador de tamaño molecular Cien Marker.

Referencia

- Karch H, Bohm 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: 1200-5.

1.4.1-Protocolo PCR factor *eae*

Cepas de referencia	Control
E. coli 2348/69 (EPEC)	Positivo
E. coli E32511 (STEC)	Positivo
E. coli ATCC 25922 sin factores de virulencia	Negativo

Programa de amplificación

Paso Nº	Etapa	Temperatura ºC	Tiempo	Va al paso Nº	Nº veces
1	Desnaturalización	94	5 min		
2	Desnaturalización	94	30 seg		
3	Pegado de primers ó annealing	54	1 min		
4	Extensión	72	2 min	2	29
5	Extensión	72	2 min		
6	Pausa	4			

Características del gel	Marcador de peso molecular
Agarosa al 1% en buffer TAE 1X	100 pb

Tamaño del fragmento

Primers	Tamaño del Fragmento (pb)
SK1 / SK2	864

Protocolo PCR factor *eae* **Fecha:**

Reactivo	Concentración de trabajo del reactivo	Concentración del reactivo en la mezcla	Volumen del reactivo en la mezcla para una determinación (µl)	Volumen del reactivo en la mezcla para Nº determinaciones (µl)
Buffer	10X	1X	5	
Mezcla dNTP	2,5 mM	0,1 Mm	2	
Cl_2Mg	25 mM*	1 mM	2	
Primer SK1	0,1 nmol/ul	0,4 pmol/ul	0,2	
Primer SK2	0,1 nmol/ul	0,4 pmol/ul	0,2	
Taq polimerasa	5 U/ul	0,02 U/ul	0,2	
Templado			2	
H_2O ddd			38,4	
Vol. Final			50	

***La concentración del Cl_2Mg puede variar según la marca comercial del equipo de la Taq polimerasa. En general se comercializa el Cl_2Mg a 25 ó 50 mM. Si se dispone la concentración de 50 mM, se utiliza 1 µl de Cl_2Mg y 39,4 µl de H_2O ddd por determinación.

Microtubo Nº	Identificación de la muestra	Colonia Nº	Resultado
1	#1		
2	#2		
3	#3		
4	#4		
5	#5		
6	#6		
7	#7		
8	Control positivo 2348/69		
9	Control positivo E32511		
10	Control negativo ATCC 25922		
N	Control reactivos		

1.5.- PCR variantes factor *eae*

Se utilizan los "primers" iniciadores de Ramachandran., que amplifican un fragmento de 840-880 pb de la región variable del gen *eae* correspondiente al extremo 3´ de la secuencia de la proteína intimina.

Primer	Secuencia del primer (5'-3')	Tamaño del fragmento de amplificación (pb)
EaeVF	AGYATTACTGAGATTAAG	840-880
EaeVR	AAATTATTYTACACARAY	
EaeZetaVR	AGTTTATTTTACGCAAGT	
EaeIotaVR	TTAAATTATTTTATGCAAAC	

Referencia

- Ramachandran V, Brett K, Hornitzky MA, Dowton M, Bettelheim KA, Walker MJ, Djordjevic SP. Distribution of intimin subtypes among *Escherichia coli* isolates from ruminant and human sources. J. Clinical. Microbiol. 2003; 41: 5022-32.

1.5.1-Protocolo PCR variantes factor *eae*

Cepas de referencia	Control
E. coli 2348/69 (EPEC)	Positivo
E. coli ATCC 25922 sin factores de virulencia	Negativo

Programa de amplificación

Paso Nº	Etapa	Temperatura ºC	Tiempo	Va al paso Nº	Nº veces
1	Desnaturalización	94	1 min		
2	Pegado de primers ó annealing	42	1 min		
3	Extensión	72	1 min	2	33
4	Extensión	72	5 min		
5	Pausa	4			

Características del gel	Marcador de peso molecular
Agarosa al 1% en buffer TAE 1X	100 pb

Tamaño del fragmento

Primers	Tamaño del Fragmento (pb)
EaeVF / EaeVR / EaeZetaVR / EaeIotaVR	840-880

Protocolo PCR variantes factor *eae* **Fecha:**

Reactivo	Concentración de trabajo del reactivo	Concentración del reactivo en la mezcla	Volumen del reactivo en la mezcla para una determinación (µl)	Volumen del reactivo en la mezcla para Nº determinaciones (µl)
Buffer	10X	1X	5	
Mezcla dNTP	2,5 mM	0,1 Mm	2	
Cl_2Mg	25 mM*	1,5 mM	3	
Primer	0,1 nmol/ul	1 pmol/ul	0,5	
Primer	0,1 nmol/ul	1 pmol/ul	0,5	
Primer	0,1 nmol/ul	1 pmol/ul	0,5	
Primer	0,1 nmol/ul	1 pmol/ul	0,5	
Taq polimerasa	5 U/ul	0,02 U/ul	0,2	
Templado			5	
H_2O ddd			32,8	
Vol. Final			50	

*****La concentración del Cl_2Mg puede variar según la marca comercial del equipo de la Taq polimerasa. En general se comercializa el Cl_2Mg a 25 ó 50 mM. Si se dispone la concentración de 50 mM, se utiliza 2 µl de Cl_2Mg y 34,3 µl de H_2O ddd por determinación.

Microtubo Nº	Identificación de la muestra	Colonia Nº	Resultado
1	#1		
2	#2		
3	#3		
4	#4		
5	#5		
6	#6		
7	#7		
8	Control positivo 2348/69		
9	Control negativo ATCC 25922		
N	Control reactivos		

1.6.- PCR bundle forming pilus de EPEC (*bfp*)

Se utilizan los "primers" iniciadores de Gunzburg et al., que amplifican un fragmento de 326 pb de la región del gen *bfp* para EPEC típico.

Primer	Secuencia del primer (5'-3')	Tamaño del fragmento de amplificación (pb)
EP1	AATGGTGCTTGCGCTTGCTGC	326
EP2	GCCGCTTTATCCAACCTGGTA	

Referencia

- Gunzburg ST, Tornieporth NG, Riley LW. Identification of Enteropathogenic *Escherichia coli* by PCR-based detection of the Bundle-Forming Pilus gene. J. Clin. Microbiol.1995; 33: 1375-7.

1.6.1-Protocolo PCR bundle forming pilus de EPEC (*bfp*)

Cepas de referencia	Control
E. coli 2348/69 (EPEC)	Positivo
E. coli ATCC 25922 sin factores de virulencia	Negativo

Programa de amplificación

Paso Nº	Etapa	Temperatura ºC	Tiempo	Va al paso Nº	Nº veces
1	Desnaturalización	94	5 min		
2	Desnaturalización	94	30 seg		
3	Pegado de primers ó annealing	60	1 min		
4	Extensión	72	1 min	2	29
5	Extensión	72	2 min		
6	Pausa	4			

Características del gel	Marcador de peso molecular
Agarosa al 1% en buffer TAE 1X	100 pb

Tamaño del fragmento

Primers	Tamaño del Fragmento (pb)
EP1/EP2	326

Protocolo PCR *bfp* **Fecha:**

Reactivo	Concentración de trabajo del reactivo	Concentración del reactivo en la mezcla	Volumen del reactivo en la mezcla para una determinación (µl)	Volumen del reactivo en la mezcla para Nº determinaciones (µl)
Buffer	10X	1X	5	
Mezcla dNTP	2,5 mM	0,15 Mm	3	
Cl_2Mg	25 mM*	1 mM	2	
Primer EP1	0,1 nmol/ul	0,6 pmol/ul	0,3	
Primer EP2	0,1 nmol/ul	0,6 pmol/ul	0,3	
Taq polimerasa	5 U/ul	0,03 U/ul	0,3	
Templado			2	
H_2O ddd			37,1	
Vol. Final			50	

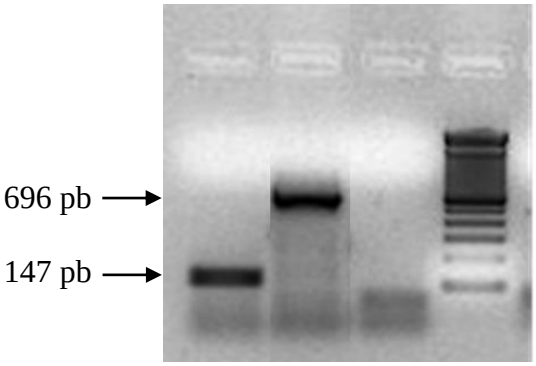
***La concentración del Cl_2Mg puede variar según la marca comercial del equipo de la Taq polimerasa. En general se comercializa el Cl_2Mg a 25 ó 50 mM. Si se dispone la concentración de 50 mM, se utiliza 1 µl de Cl_2Mg y 38,1 µl de H_2O ddd por determinación.

Microtubo Nº	Identificación de la muestra	Colonia Nº	Resultado
1	#1		
2	#2		
3	#3		
4	#4		
5	#5		
6	#6		
7	#7		
8	Control positivo 2348/69		
9	Control negativo ATCC 25922		
N	Control reactivos		

1.7.- PCR múltiple *lt* / *st*

Se utilizan los "primers" iniciadores de: Schultsz C et al., que amplifican un fragmento de 696 pb de la región del gen correspondiente a la subunidad A de la toxina LT de ETEC; y los de Hornes et al., que amplifican un fragmento de 147 pb correspondiente al gen de la toxina ST de ETEC.

Primer	Secuencia del primer (5'-3')	Tamaño del fragmento de amplificación (pb)
LT-A1	GGCGACAGATTATACCGTGC	696
LT-A2	CCGAATTCTGTTATATATGTC	
AL-65	TTAATAGCACCCGGTACAAGCAGG	147
AL-125	CCTGACTCTTCAAAAGAGAAAATTAC	



Productos de amplificación por PCR para la detección de los genes *lt* y *st* en cepas de referencia. Línea 1: control positivo *E. coli* O126-53 *st* +. Línea 2: control positivo *E. coli* EBA-35 *lt*+. Línea 3: Control de reactivos. Línea 4: marcador de tamaño molecular Cien Marker.

Referencias

- Schultsz C, Pool GJ, Ketel RV, Wever B, Speelman P, Dankert J. Detection of Enterotoxigenic *Escherichia coli* in stool samples by using nonradioactively labelled oligonucleotide DNA probes and PCR. . J. Clin. Microbiol. 1994; 32: 2393-7.
- Hornes E, Wasteson Y, Olsvik O. Detection of *Escherichia coli* Heat –Stable enterotoxin genes in pig stool specimens by an immobilized, colorimetric, nested polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. 1991; 29: 2375-9.

1.7.1.-Protocolo PCR múltiple *lt* / *st*

Cepas de referencia	Control
E. coli EBA-35 *lt* (ETEC)	Positivo
E. coli O126-53 *st* (ETEC)	Positivo
E. coli ATCC 25922 sin factores de virulencia	Negativo

Programa de amplificación

Paso Nº	Etapa	Temperatura ºC	Tiempo	Va al paso Nº	Nº veces
1	Desnaturalización	95	5 min		
2	Desnaturalización	95	30 seg		
3	Pegado de primers ó annealing	56	1 min		
4	Extensión	72	1 min	2	29
5	Extensión	72	2 min		
6	Pausa	4			

Características del gel	Marcador de peso molecular
Agarosa al 2% en buffer TAE 1X	100 pb

Tamaño de los fragmentos

Primers	Tamaño del Fragmento (pb)
LT-A1 / LT-A2	696
AL-65 / AL-125	147

Protocolo PCR múltiple *lt* / *st* **Fecha:**

Reactivo	Concentración de trabajo del reactivo	Concentración del reactivo en la mezcla	Volumen del reactivo en la mezcla para una determinación (µl)	Volumen del reactivo en la mezcla para Nº determinaciones (µl)
Buffer	10X	1X	5	
Mezcla dNTP	2,5 mM	0,2 mM	2	
Cl_2Mg	25 mM	1.5 mM	3	
LT-A1	0,1 nmol/µl	0,25 pmol/µl	0,125	
LT-A2	0,1 nmol/µl	0,25 pmol/µl	0,125	
AL-65	0,1 nmol/µl	1,2 pmol/µl	1,2	
AL-125	0,1 nmol/µl	1,2 pmol/µl	1,2	
Taq polimerasa	5 U/µl	0,0125 U/µl	0,4	
Templado			2	
H_2O ddd			34,95	
Vol. Final			50	

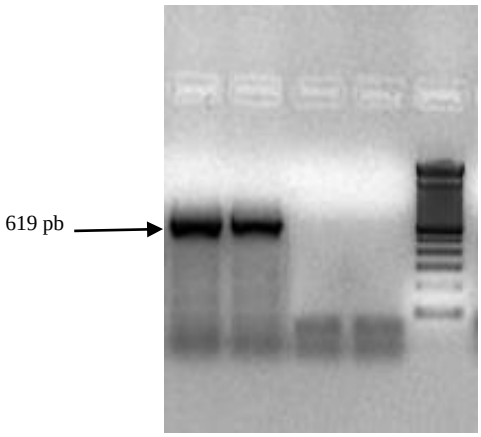
* La concentración del Cl_2Mg puede variar según la marca comercial del equipo de la Taq polimerasa. En general se comercializa el Cl_2Mg a 25 ó 50 mM. Si se dispone la concentración de 50 mM, se utiliza 1,5 µl de Cl_2Mg y 36,45 µl de H_2O ddd por determinación.

Microtubo Nº	Identificación de la muestra	Colonia Nº	Resultado
1	#1		
2	#2		
3	#3		
4	#4		
5	#5		
6	#6		
7	#7		
8	#8		
9	Control positivo EBA-35		
	Control positivo 126-53		
10	Control negativo ATCC 25922		
N	Control reactivos		

1.8.- PCR *IpaH*

Se utilizan los "primers" iniciadores de Sethabutr et al., que amplifican un fragmento de 619 pb de la región del gen correspondiente a la secuencia IpaH de EIEC y de *Shigella* spp.

Primer	Secuencia del primer (5'-3')	Tamaño del fragmento de amplificación (pb)
IpaH8B	GTTCCTTGACCGCCTTTCCGA	619
IpaH15B	GCCGGTCAGCCACCCTCTGAG	



Productos de amplificación por PCR para la detección de los genes *IpaH,* en una cepa aislada de un caso clínico y en una capa de referencia. Línea 1: *E. coli* O124 *IpaH*+, aislada de un caso de diarrea. Línea 2: control positivo *E. coli* C-481 *IpaH*+. Línea 3: control negativo *E. coli* ATCC 25922 sin factores de virulencia. Línea 4: Control de reactivos. Línea 5: marcador de tamaño molecular Cien Marker.

Referencias

- Scethabutr 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: 265-9.

1.8.1.-Protocolo PCR *IpaH*

Cepas de referencia	Control
E. coli C-481 *ipaH* (EIEC)	Positivo
E. coli ATCC 25922 sin factores de virulencia	Negativo

Programa de Amplificación

Paso Nº	Etapa	Temperatura ºC	Tiempo	Va al paso Nº	Nº veces
1	Desnaturalización	94	5 min		
2	Desnaturalización	94	30 seg		
3	Pegado de primers ó annealing	55	1 min		
4	Extensión	72	90 seg	2	24
5	Extensión	72	5 min		
6	Pausa	4			

Características del gel	Marcador de peso molecular
Agarosa al 2% en buffer TAE 1X	100 pb

Tamaño del fragmento

Primers	Tamaño del Fragmento (pb)
IpaH8B / IpaH15B	619

Protocolo PCR múltiple *IpaH* **Fecha:**

Reactivo	Concentración de trabajo del reactivo	Concentración del reactivo en la mezcla	Volumen del reactivo en la mezcla para una determinación (µl)	Volumen del reactivo en la mezcla para Nº determinaciones (µl)
Buffer	10X	1X	5	
Mezcla dNTP	2,5 mM	0,1 mM	2	
Cl_2Mg	25 mM	1,5 mM	3	
IpaH8	0,1 nmol/µl	0,25 pmol/µl	0,125	
IpaH15	0,1 nmol/µl	0,25 pmol/µl	0,125	
Taq polimerasa	5 U/µl	0,03 U/µl	0,3	
Templado			2	
H2O ddd			37,45	
Vol. Final			50	

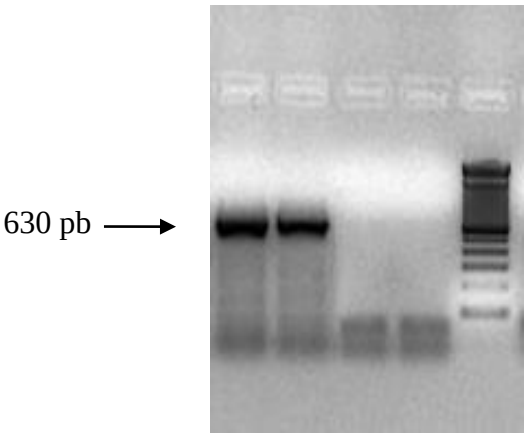
* La concentración del Cl_2Mg puede variar según la marca comercial del equipo de la Taq polimerasa. En general se comercializa el Cl_2Mg a 25 ó 50 mM. Si se dispone la concentración de 50 mM, se utiliza 1,5 µl de Cl_2Mg y 38,95 µl de H_2O ddd por determinación.

Microtubo Nº	Identificación de la muestra	Colonia Nº	Resultado
1	#1		
2	#2		
3	#3		
4	#4		
5	#5		
6	Control positivo C-481		
9	Control negativo ATCC 25922		
N	Control reactivos		

1.9.- PCR pCVD432 (EAEC)

Se utilizan los "primers" iniciadores de Schmidt et al., que amplifican un fragmento 630 pb de la región del gen correspondiente a la secuencia del plásmido pCVD432 de EAEC.

Primer	Secuencia del primer (5'-3')	Tamaño del fragmento de amplificación (pb)
pCVD432-start	CTGGCGAAAGACTGTATCAT	630
pCVD432-stop	CAATGTATAGAAATCCGCTGTT	



Productos de amplificación por PCR para la detección del gen específico del plámido pCVD432, en una cepa aislada de un caso clínico y en una cepa de referencia. Línea 1: *E. coli* O128, aislada de un caso de diarrea. Línea 2: control positivo *E. coli* 17-2. Línea 3: control negativo *E. coli* ATCC 25922 sin factores de virulencia. Línea 4: Control de reactivos. Línea 5: marcador de tamaño molecular Cien Marker.

Referencias

- Schmidt H, Knop C, Franke S, Aleksic S, Heesemann J, Karch H. Development of PCR for Screening of Enteroaggregative *Escherichia coli*. J. Clin. Microbiol. 1995; 33: 701-5.

1.9.1.-Protocolo PCR pCVD432 (EAEC)

Cepas de referencia	Control
E. coli 17-2 *pCVD 432* (EAEC)	Positivo
E. coli ATCC 25922 sin factores de virulencia	Negativo

Programa de Amplificación

Paso Nº	Etapa	Temperatura ºC	Tiempo	Va al paso Nº	Nº veces
1	Desnaturalización	94	5 min		
2	Desnaturalización	94	30 seg		
3	Pegado de primers ó annealing	55	1 min		
4	Extensión	72	50 seg	2	29
5	Extensión	72	5 min		
6	Pausa	4			

Características del gel	Marcador de peso molecular
Agarosa al 2% en buffer TAE 1X	100 pb

Tamaño del fragmento

Primers	Tamaño del Fragmento (pb)
pCVD432-start / pCVD432-stop	630

Protocolo PCR pCVD432 (EAEC) **Fecha:**

Reactivo	Concentración de trabajo del reactivo	Concentración del reactivo en la mezcla	Volumen del reactivo en la mezcla para una determinación (µl)	Volumen del reactivo en la mezcla para Nº determinaciones (µl)
Buffer	10X	1X	5	
Mezcla dNTP	2,5 mM	0,1 mM	2	
Cl_2Mg	25 mM	2 mM	4	
pCVD432-start	0,1 nmol/µl	0,4 pmol/µl	0,2	
pCVD432-stop	0,1 nmol/µl	0,4 pmol/µl	0,2	
Taq polimerasa	5 U/µl	0,02 U/µl	0,2	
Templado			2	
H2O ddd			36,4	
Vol. Final			50	

* La concentración del Cl_2Mg puede variar según la marca comercial del equipo de la Taq polimerasa. En general se comercializa el Cl_2Mg a 25 ó 50 mM. Si se dispone la concentración de 50 mM, se utiliza 0,75 µl de Cl_2Mg y 37,6 µl de H_2O ddd por determinación.

Microtubo Nº	Identificación de la muestra	Colonia Nº	Resultado
1	#1		
2	#2		
3	#3		
4	#4		
5	#5		
7	Control positivo 17-2		
9	Control negativo ATCC 25922		
N	Control reactivos		

1.10.- PCR *aaiC*

Se utilizan los "primers" iniciadores de Boisen et al., que amplifican un fragmento 313 pb de la región del gen correspondiente a la secuencia de la isla cromosomal *aaiC* de EAEC.

Primer	Secuencia del primer (5'-3')	Tamaño del fragmento de amplificación (pb)
Aaic-1	TGGTGACTACTTTGATGGACATTGT	313
Aaic-2	GACACTCTCTTCTGGGGTAAACGA	

Referencias

- Boisen N, Scheutz F, Rasko DA, Redman JC, PerSchmidt H, Knop C, Franke S, Aleksic S, Heesemann J, Karch H. Development of PCR for Screening of Enteroaggregative *Escherichia coli*. J. Clin. Microbiol. 1995; 33: 701-5.

1.10.1.-Protocolo PCR *aaiC*

Cepas de referencia	Control
E. coli 17-2 *aaiC*	Positivo
E. coli ATCC 25922 sin factores de virulencia	Negativo

Programa de Amplificación

Paso Nº	Etapa	Temperatura ºC	Tiempo	Va al paso Nº	Nº veces
1	Desnaturalización	94	2 min		
2	Desnaturalización	94	50 seg		
3	Pegado de primers ó annealing	57	1 min 30 seg		
4	Extensión	72	1 min 30 seg	2	34
5	Pausa	4			

Características del gel	Marcador de peso molecular
Agarosa al 2% en buffer TAE 1X	100 pb

Tamaño del fragmento

Primers	Tamaño del Fragmento (pb)
Aaic-1 / Aaic-2	313

Protocolo PCR *aaiC* **Fecha:**

Reactivo	Concentración de trabajo del reactivo	Concentración del reactivo en la mezcla	Volumen del reactivo en la mezcla para una determinación (µl)	Volumen del reactivo en la mezcla para Nº determinaciones (µl)
Buffer	10X	1X	5	
Mezcla dNTP	2,5 mM	0,1 mM	2	
Cl_2Mg	25 mM	1 mM	2	
Aaic-1	0,1 nmol/µl	0,6 pmol/µl	0,3	
Aaic-2	0,1 nmol/µl	0,6 pmol/µl	0,3	
Taq polimerasa	5 U/µl	0,03 U/µl	0,3	
Templado			2	
H2O ddd			38,1	
Vol. Final			50	

* La concentración del Cl_2Mg puede variar según la marca comercial del equipo de la Taq polimerasa. En general se comercializa el Cl_2Mg a 25 ó 50 mM. Si se dispone la concentración de 50 mM, se utiliza 1 µl de Cl_2Mg y 39,1 µl de H_2O ddd por determinación.

Microtubo Nº	Identificación de la muestra	Colonia Nº	Resultado
1	#1		
2	#2		
3	#3		
4	#4		
5	#5		
7	Control positivo 17-2		
9	Control negativo ATCC 25922		
N	Control reactivos		

1.11.- PCR *stx*1

Se utilizan los oligonucleótidos o "primers" iniciadores de Zhang et al., que amplifican un fragmento de 282 pb de la región del gen correspondiente a la subunidad B común para stx_1 y stx_{1c}.

Primer	Secuencia del primer (5'-3')	Tamaño del fragmento de amplificación (pb)
KS7	CCCGGATCCATGAAAAAAACATTATTAATAGC	282
KS8	CCCGAATTCAGCTATTCTGAGTCAACG	

Referencias

- Zhang WL, Bielaszewska M, Kuezius T, Karch H. Identification, characterization, and distribution of Shiga toxin 1 gene variant (stx_{1c}) in *Escherichia coli* isolated from humans. J. Clin. Microbiol. 2002; 40: 1441-6.

1.11.1.- Protocolo PCR *stx*1

Cepas de referencia	Control
E. coli FP110/05 O157:H7 Stx1/Stx2	Positivo
E. coli ATCC 25922 sin factores de virulencia	Negativo

Programa de amplificación

Paso Nº	Etapa	Temperatura ºC	Tiempo	Va al paso Nº	Nº veces
1	Desnaturalización	94	5 min		
2	Desnaturalización	94	30 seg		
3	Pegado de primers ó Annealing	52	1 min		
4	Extensión	72	40 seg	2	29
5	Extensión	72	2 min		
6	Pausa	4			

Características del gel	Marcador de peso molecular
Agarosa al 2% en buffer TAE 1X	100 pb

Tamaño de los fragmentos

Primers	Tamaño del Fragmento (pb)
KS7 /KS8	282

Protocolo PCR *stx*1 **Fecha:**

Reactivo	Concentración de trabajo del reactivo	Concentración del reactivo en la mezcla	Volumen del reactivo en la mezcla para una determinación (µl)	Volumen del reactivo en la mezcla para Nº determinaciones (µl)
Buffer	10X	1X	5	
Mezcla dNTP	2,5 mM	0,1 mM	2	
Cl_2Mg	25 mM*	1,5 mM	3	
Primer KS7	0,1 nmol/µl	0,6 pmol/µl	0,3	
Primer KS8	0,1 nmol/µl	0,6 pmol/µl	0,3	
Taq polimerasa	5 U/µl	0,02 U/µl	0,2	
Templado			2	
H_2O ddd			37.2	
Vol. Final			50	

* La concentración del Cl_2Mg puede variar según la marca comercial del equipo de la Taq polimerasa. En general se comercializa el Cl_2Mg a 25 ó 50 mM. Si se dispone la concentración de 50 mM, se utiliza 1,5 µl de Cl_2Mg y 38,7 µl de H_2O ddd por determinación.

Microtubo Nº	Identificación de la muestra	Colonia Nº	Resultado
1	#1		
2	#2		
3	#3		
4	#4		
5	#5		
6	#6		
7	#7		
8	#8		
9	Control positivo FP110/05		
10	Control negativo ATCC 25922		
N	Control reactivos		

1.12.- PCR *stx*2

Se utilizan los oligonucleótidos o "primers" iniciadores de Tyler et al., que amplifican un fragmento de 285 pb de la región del gen correspondiente a la subunidad B común para stx_2, $stx_{2vh\text{-}a}$ y $stx_{2vh\text{-}b}$.

Primer	Secuencia del primer (5'-3')	Tamaño del fragmento de amplificación (pb)
VT2-c	AAGAAGATGTTTATGGCGGT	285
VT2-d	CACGAATCAGGTTATGCCTC	

Referencias

- 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: 1339-43.

1.12.1.-Protocolo PCR *stx*2

Cepas de referencia	Control
E. coli FP110/05, O157:H7 Stx1/Stx2	Positivo
E. coli ATCC 25922 sin factores de virulencia	Negativo

Programa de amplificación

Paso Nº	Etapa	Temperatura ºC	Tiempo	Va al paso Nº	Nº veces
1	Desnaturalización	94	5 min		
2	Desnaturalización	94	30 seg		
3	Pegado de primers ó Annealing	55	30 seg		
4	Extensión	72	30 seg	2	29
5	Extensión	72	2 min		
6	Pausa	4			

Características del gel	Marcador de peso molecular
Agarosa al 2% en buffer TAE 1X	100 pb

Tamaño de los fragmentos

Primers	Tamaño del Fragmento (pb)
VT2-c / VT2-d	285

Protocolo PCR *stx*2 **Fecha:**

Reactivo	Concentración de trabajo del reactivo	Concentración del reactivo en la mezcla	Volumen del reactivo en la mezcla para una determinación (µl)	Volumen del reactivo en la mezcla para Nº determinaciones (µl)
Buffer	10X	1X	5	
Mezcla dNTP	2,5 mM	0,1 mM	2	
Cl_2Mg	25 mM*	1,5 mM	3	
Primer VT2-c	0,1 nmol/µl	0,8 pmol/µl	0,4	
Primer VT2-d	0,1 nmol/µl	0,8 pmol/µl	0,4	
Taq polimerasa	5 U/µl	0,02 U/µl	0,2	
Templado			2	
H_2O ddd			37	
Vol. Final			50	

* La concentración del Cl_2Mg puede variar según la marca comercial del equipo de la Taq polimerasa. En general se comercializa el Cl_2Mg a 25 ó 50 mM. Si se dispone la concentración de 50 mM, se utiliza 1,5 µl de Cl_2Mg y 38,5 µl de H_2O ddd por determinación.

Microtubo Nº	Identificación de la muestra	Colonia Nº	Resultado
1	#1		
2	#2		
3	#3		
4	#4		
5	#5		
6	#6		
7	#7		
8	#8		
9	Control positivo FP110/05		
10	Control negativo ATCC 25922		
N	Control reactivos		

2.- *Detección genotípica de los factores de virulencia por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa* (PCR) *en tiempo real.*

Fundamento de la Técnica de PCR

Esta técnica se fundamenta en la propiedad natural de las enzimas ADN polimerasas para replicar cadenas simples de ADN. La replicación enzimática de una molécula blanco o templado de ADN, mediante ciclos repetitivos de amplificación, permite obtener un producto fácilmente detectable. En PCR en tiempo real el producto de amplificación se va detectando a medida que se va sintetizando.

Equipamiento

- Termociclador para PCR en tiempo real
- Micropipeta para reactivos de PCR rango: 0,5 - 10 µl
- Micropipeta para reactivos de PCR rango: 5 - 40 µl
- Micropipeta para reactivos de PCR rango: 40 - 200 µl
- Micropipeta para el templado de ADN rango: 0,5 - 10 µl
- Micropipeta para amplicones: 5- 40 µl
- Baño de agua para hervir
- Microcentrifuga para tubos Eppendorf
- Freezer -20ºC
- Heladera 4ºC

Materiales

- Ansa de aguja
- Tubos Eppendorf 1,5 ml
- Microtubos ópticos pared delgada PCR 0,2 ml
- Tapas para microtubos opticos
- Tips con filtro para aerosoles
- Recipiente con hielo

Reactivos

- Buffer Titrón X-100 al 1% en buffer TE 1X
- Buffer PCR10X
- Mezcla de dNTPs: dATP, dCTP, dGTP, y dTTP: 2,5 mM
- Cl_2Mg 25 ó 50 mM
- Par de primers específicos: 0,1 nmol/µl

- Sonda de hidrólisis específica marcada con un fluoroforo cuya fluorescencia pueda medirse con el equipo de PCR
- Hot StarTaq (5 minutos de activación a 95°C) DNA Polimerasa con actividad 5´exonucleasa: 5U/µl
- Agua tridestilada estéril (H_2O ddd)

a) **Preparación de la muestra**

Procedimiento	**Comentarios**
1. Tomar una ansada de cultivo correspondiente a la zona de crecimiento confluente de las placas de cultivo.	• La técnica de PCR es de muy alta sensibilidad. Se recomienda establecer diferentes áreas de trabajo para evitar la obtención de falsos resultados positivos por contaminaciones cruzadas: **5.** Área de procesamiento de la muestra y obtención del ADN. (Ver FIGURA 1A) **6.** Área de preparación de la mezcla de reacción. (Ver FIGURA 1B) **7.** Área para el agregado del templado y amplificación. (Ver FIGURA 1C) **8.** Área de detección de los productos de amplificación. (Ver FIGURA 1D)
2. Resuspender la muestra en 150 µl de buffer Titrón X-100 al 1% en buffer TE 1X.	• Fraccionar el buffer Titrón en tubos Eppendorf de 1,5 ml de capacidad, en el área de preparación de la mezcla de reacción. Utilizar micropipeta para uso exclusivo de reactivos, y tips con filtro para aerosoles. Luego trasladar los tubos al área de procesamiento de la muestra para preparar el extracto de ADN. • Frotar el ansa cargada de muestra contra las paredes del tubo con buffer Titrón.
3. Seleccionar 5 colonias presuntivas con igual morfología, de las placas de cultivo.	

4. Picar las colonias con ansa de aguja y resuspenderlas en 150 µl de Buffer Titrón X-100 al 1% en buffer TE 1X.	• Frotar el ansa contra las paredes del tubo.
5. Preparar el extracto de ADN de las cepas de referencia que serán utilizadas como controles (positivo y negativo) en la reacción. Seguir los pasos 3, 4, y 8	• Verificar las cepas de referencia que se utilizan en cada protocolo de PCR.
6. Hervir en baño de agua a 100ºC durante 15 minutos	• El efecto conjunto del detergente Titrón y el calentamiento produce la lisis bacteriana y la liberación del ADN. • Tomar la precaución de cerrar bien los tubos Eppendorf antes de hervir.
7. Centrifugar a 10.000 rpm durante 5 minutos.	• Luego de la centrifugación, se obtiene un pellet correspondiente al debris bacteriano y un sobrenadante donde se encuentra el ADN.
8. Conservar el extracto de ADN a 4ºC para ser utilizado como templado en la reacción de PCR.	• El extracto de ADN puede conservarse en freezer a -20ºC para ser utilizado en otra PCR. Conservarlos en un área libre de reactivos. • Si el extracto es descongelado, es necesario realizar una centrifugación a 10.000 rpm por 5 minutos antes de utilizarlo.

b) **Preparación de la mezcla de reacción**

Procedimiento	**Comentarios**
1. Retirar los reactivos para la PCR del freezer de -20ºC. Esperar que los mismos se descongelen y colocarlos en un recipiente con hielo.	• Los reactivos para PCR deben conservarse en freezer a -20ºC en un área específica para tal fin. Se recomienda cubrir el tubo que contiene la sonda de hidrólisis con papel de aluminio para proteger al reactivo de la luz.
2. Establecer el número de determinaciones y completar el protocolo de la PCR a realizar (Ver Protocolo específico)	• Realizar el siguiente cálculo para determinar el número de determinaciones: Nº de determinaciones = Nº de muestras presuntivas + Control Positivo + Control Negativo + Control Reactivos + 1 • Se suma 1 para calcular, en exceso, el volumen total de la mezcla de reacción. Se contempla de esta manera los probables errores de pipeteo que pueda cometer el operador.

3. Para cada reactivo, calcular los volúmenes necesarios en la mezcla de reacción, de acuerdo al número de determinaciones

- Las concentraciones de los reactivos de trabajo, de los reactivos en la mezcla y los volúmenes de los reactivos para una determinación, se indican en el protocolo específico de cada PCR.
- Realizar el siguiente cálculo para determinar el volumen de cada reactivo en la mezcla:

Vol. del Rvo. en la mezcla para n determinaciones	=	Vol. del Rvo. en la mezcla para una determinación	X	Nº de determinaciones

4. Preparar la mezcla en un tubo Eppendorf de 1,5 ml. agregando los reactivos en el siguiente orden:
   g. H_2O ddd
   h. Buffer PCR
   i. dNTPs
   j. Cl_2Mg
   k. Primers
   l. Sonda de hidrólisis
   m. Taq polimerasa

- Preparar la mezcla en un área o superficie libre de bacterias, muestras de ADN o productos amplificados.
- Utilizar micropipetas exclusivas para reactivos de PCR y tips con filtro para aerosoles.
- Homogenizar los reactivos antes de usarlos.
- La enzima debe permanecer siempre a -20ºC para evitar que baje su actividad.
- En el momento que deba ser utilizada, retirarla del freezer y colocarla rápidamente en un bloque frío.

5. Resuspender la mezcla con micropipeta y fraccionar 20 µl en cada microtubo óptico de PCR.

- Descartar el resto de volumen que queda en el tubo de 1,5 ml. Este sobrante, corresponde al volumen de muestra para una determinación calculado previamente en exceso.

6. Cerrar y trasladar los microtubos de PCR al área de carga de los templados y donde se encuentra el termociclador.

- Asegurarse que estén bien tapados los tubos evitando el toqueteo.

c) **Carga de los templados y amplificación**

Procedimiento

1. Agregar a cada microtubo, 5 µl del templado correspondiente. Al microtubo de control de reactivos se agrega 2 µl de H_2O ddd.

Comentarios

- Para cargar los templados se debe utilizar una micropipeta exclusiva para manipulear ADN y tips con filtro para aerosoles.
- El volumen del templado se toma del sobrenadante del tubo donde se prepara el extracto de ADN.

2. Colocar los microtubos en el termociclador y activar el programa de amplificación específico para cada PCR. (Ver Protocolo PCR)

d) **Detección del producto de amplificación**

Procedimiento	**Comentarios**
1. Leer la aparición de la curva de fluorescencia	• Si el gen a identificar está presente en la mezcla de reacción, el producto de amplificación podrá detectarse a medida que se va sintetizando observando la aparición de la curva de fluorescencia.
2. Dejar que se complete el programa de amplificación.	
3. Observar la forma de la curva de amplificación-fluorescencia	• El equipo cuantifica la cantidad de fluorescencia en cada ciclo y representa una gráfica (curva de forma sigmoidea): fluorescencia vs. ciclo PCR. En la curva se determina la línea basal de fluorescencia en los ciclos iniciales de PCR donde no hay cambios significativos en la señal de fluorescencia y el nivel umbral fijado en la región exponencial de la gráfica de amplificación con un valor de fluorescencia superior a la fluorescencia basal.
4. Determinar el ciclo umbral (CT)	• El ciclo en el cual se alcanza la fluorescencia del nivel umbral corresponde al ciclo umbral o del inglés "Threshold cycle" (CT). A mayor cantidad de ADN menor será el CT para alcanzar el nivel de fluorescencia umbral. Se considera que una muestra es positiva cuando se obtiene un CT menor de 38.

2.1.- mRT-PCR *stx*1 / *stx*2

Se utilizan los oligonucleótidos o "primers" iniciadores y sondas de hidrólisis de Thuy Duon et al., que amplifican un fragmento de 113 pb del gen de Stx1 y un fragmento de 111 pb del gen de Stx2.

Gen	Primers / sondas	Secuencia (5'-3')
vtx1	vtx1_EHEC_F	GCATCTGATGAGTTTCCTTCTA
	vtx1_EHEC_R	GTTCTGCGCATCAGAATTG
	vtx1_EHEC_probe	FAM-AAGAGKCCGTGGGATTACGCACAAT-BHQ1
vtx2	vtx2_EHEC_F	ACRACGGACAGCAGYTATWC
	vtx2_EHEC_R	GAACTCCATTAAMKCCAGATA
	vtx2_EHEC_probe	LC610-ATGCAAATCAGTCGTCACTCACTGGT-BHQ1

Referencias

- Vu Thuy Duon, Le Thi Phuong Tu, Ha Thanh Tuyen, Tran Thi Phuong Nhu, Le Thi Quynh Nhi, James Campbell, Pham Van Minh, Hoang Le Phuc, Tran Thi Hong Chau, Nguyen Minh Ngoc, Lu Lan Vi, Iruka and Stephen Baker. Optimizing multiplex real-time PCR assays revealed high carrier rates of diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes among healthy and diarrheal children in the South of Vietnam. In press. 2019

2.1.1.-Protocolo mRT-PCR *stx*1 / *stx*2

Cepas de referencia	Control
E. coli FP110/05, O157:H7 Stx1/Stx2	Positivo
E. coli ATCC 25922 sin factores de virulencia	Negativo

Programa de amplificación

Paso Nº	Etapa	Temperatura ºC	Tiempo	Va al paso Nº	Nº veces
1	Activación	95	5 min		
2	Desnaturalización	95	15 seg		
3	Pegado de primers ó Annealing	60	60 seg	2	44
4	Enfriamiento	37	2 min		

Protocolo mRT-PCR *stx*1 / *stx*2

Reactivo	Concentración de trabajo del reactivo	Concentración del reactivo en la mezcla	Volumen del reactivo en la mezcla para una determinación (µl)	Volumen del reactivo en la mezcla para Nº determinaciones (µl)
10X Buffer	10X	1X (1.5 $MgCl_2$)	2.5	
$MgCl_2$	25Mm	3.5mM	3.5	
dNTPs	2,5 Mm	0.2mM	2	
vtx1_Forward	10µM	0.2µM	0.5	
vtx1_Reverse	10µM	0.2µM	0.5	
vtx2_Forward	10µM	0.2µM	0.5	
vtx2_Reverse	10µM	0.2µM	0.5	
vtx1_FAM_Probe	10µM	0.08µM	0.2	
vtx2_LC610 probe	10µM	0.08µM	0.2	
HotstartTaq polimerasa	5U/µl	1U/25µl	0.2	
Agua grado BM			9,4	
Templado			5	
Total			25	

FIGURA 1

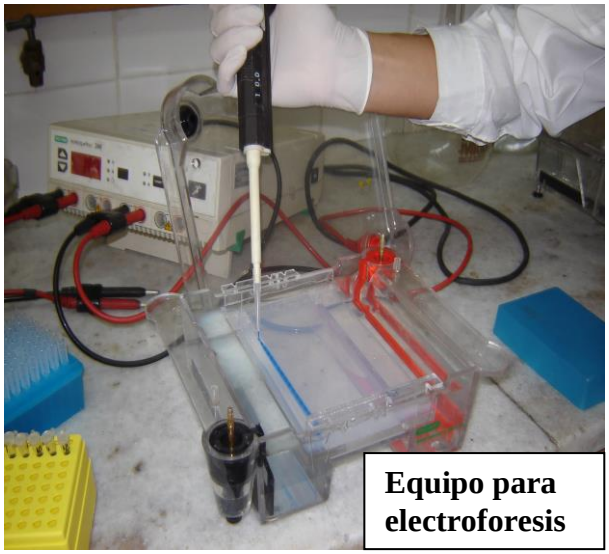
Áreas de trabajo en el laboratorio de PCR

1A- Área de procesamiento de la muestra y obtención del ADN

1B- Área de preparación de la mezcla de reacción

1C-Área para el agregado del templado y amplificación

1D-Área de detección de los productos de amplificación



Composición y preparación de reactivos para PCR

Los reactivos utilizados pueden ser adquiridos comercialmente o pueden ser preparados como se describe a continuación:

1. Buffer PCR 10X

- KCl 500 Mm
- Gelatina 0,1%
- Tris-HCl 100 mM (pH 8,3)

Este buffer forma parte del Kit de la enzima Taq polimerasa y puede presentar variaciones según la marca comercial.

2. Cl_2Mg 25 ó 50 mM

Este reactivo forma parte del equipo o kit de la enzima Taq polimerasa y puede presentar variaciones según la marca comercial.

3. Nucleótidos trifosfatos

Reactivo de stock

- Set de dATP, dCTP, dGTP y dTTP 100 mM (c/u)

Reactivo de trabajo

Mezcla 2,5 mM de los cuatro nucléotidos

Para 1000 µl

- dATP 100 mM 25µl
- dCTP 100 mM 25µl
- dGTP 100 mM 25µl
- dTTP 100 mM 25µl
- H_2O ddd 900µl

4. Primers

Se recomienda el uso de oligonucléotidos desalados. Para su reconstitución seguir las indicaciones del fabricante. Llevar a una concentración de trabajo de 0,1 nmol/µl

5. Buffer Tris-EDTA (TE)

Solución Tris-EDTA concentrada 10X

- Tris- HCl 1M (pH 8): 100 ml
- EDTA 0,5 M (pH 8): 20 ml

Vol. Final: 1000 ml

Solución Tris- HCl 1M (pH 8)

Tris base: 121,1 g

HCl 6 N: 43 ml

Vol final: 1000 ml

Ajustar a pH 8 con HCl 6 N

Buffer EDTA 0,5 M (pH 8)

EDTA: 186,1 g

Vol final: 1000 ml

Llevar a pH8

Titrón X-100 al 1% en buffer TE 1X.

- Se realiza una dilución 1:10 de la solución concentrada Tris-EDTA 10X.
- Autoclavar
- Buffer TE 1X 50 ml (estéril)
- Titrón X-100 0,5 ml

Dispensar el Titrón en el buffer TE 1X y mezclar enérgicamente

Solución de trabajo TE 1X (pH7) para reconstituir primers

- TE 1X (pH7)

Tris- HCl 1M (pH 7): 1 ml

EDTA 0,5 M (pH 8): 200 µl

Vol. Final: 100 ml

- Solución Tris- HCl 1M (pH 7)

Tris base: 12,1 g

Vol. final: 100 ml

Ajustar a pH 7 con HCl 6 N

6. Buffer Tris-Acetato EDTA (TAE)

Solución concentrada 50X

Por litro

- Tris base 242 g
- Acido acético glacial 57,1ml
- 0,5 M EDTA (pH 8) 100 ml

Solución de trabajo 1X

- Se realiza una dilución 1:50 de la solución concentrada 50X.

7. Buffer de siembra 1

Para 100 ml

- Glicerol 30% 30 ml
- Xilenecianol 0,05% 0,05 g
- Agua estéril 70 ml

8. Buffer de siembra 2

Para 100 ml

- Glicerol 30% 30 ml
- Azul de Bromofenol 0,25% 0,25 g
- Agua estéril 70 ml

CAPÍTULO IV - DIAGNÓSTICO INDIRECTO

1.- ELISA para la detección de anticuerpos a-O157, a-O145, a-O121 y a-O103.

Fundamento de la Técnica de ELISA

Se realiza la técnica de ELISA sandwich basada en la utilización de glicoconjugados, obtenidos por ingeniería genética. Cada glicoconjugado serogrupo específico contiene sitios del extremo del polisacárido de la molécula de LPS, diseñado para ser utilizados como antígeno de captura y promover la reacción Ag-AC específica, requerida para un diagnóstico válido. Los complejos Ag-Ac luego se revelan utilizando un conjugado marcado y el sustrato correspondiente. Mediante este ELISA se detectan anticuerpos IgG e IgM, dirigidos a O157, O145, O121, y O103.

Equipamiento

· Micropipeta para reactivos de PCR rango: 0,5 - 10 µl

· Micropipeta para reactivos de PCR rango: 5 - 40 µl

· Micropipeta para reactivos de PCR rango: 40 - 200 µl

· Micropipeta para suero rango: 0,5 - 10 µl

· Micropipeta multicanal 50-200 µl

· Lector de placa.

· Freezer -20ºC

· Heladera 4ºC

· Agitador orbital

· Cronómetro.

Materiales

· Tips 10, 100, 200 y 1000 µl

· Cubeta para dispensa de reactivos

· Tubos Eppendorf 1,5 ml

· Recipiente para preparación de solución de lavado.

· Papel aluminio

Reactivos

· Kit CHEMLIS® E. coli O157 Glyco-iELISA

· Kit CHEMLIS® E. coli O145 Glyco-iELISA

· Kit CHEMLIS® E. coli O121 Glyco-iELISA

· Kit CHEMLIS® E. coli O103 Glyco-iELISA

· Agua calidad molecular

1- Protocolo de trabajo. Se prepara una plantilla como se muestra a continuación, siguiendo las siguientes pautas para la realización de la metodología.

· Se utiliza una placa sensibilizada con un glicoconjugado específico.

· Las muestras y los controles se siembran por duplicado para la determinación de IgG e IgM, respectivamente. Para ello se siembra cada muestra/control en 4 pocillos según se muestra en la figura. De los 4 pocillos, los 2 pocillos superiores corresponderá a la detección de IgM y los 2 inferiores a IgG.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Siembra Conjugado
A	C+		Muestra 2		Muestra 6		Muestra 10		Muestra 14		Muestra 18		IgM
B													IgG
C	C -		Muestra 3		Muestra 7		Muestra 11		Muestra 15		Muestra 19		IgM
D													IgG
E	blanco		Muestra 4		Muestra 8		Muestra 12		Muestra 16		Muestra 20		IgM
F													IgG
G	Muestra 1		Muestra 5		Muestra 9		Muestra 13		Muestra 17		Muestra 21		IgM
H													IgG

2- Procedimiento de ELISA. Seguir las instrucciones del fabricante.
A continuación, se detalla una guía rápida.

1. Dejar que los reactivos alcancen la temperatura ambiente (20-25°C).	
2. Agregar por duplicado 100 µl por pocillo del control positivo, control negativo y blanco de muestra según el esquema de la Figura.	Ver ítem-Preparación de los controles en el instructivo del fabricante.
3. Agregar por duplicado 100 µl por pocillo de cada muestra de suero.	Ver ítem. Preparación de las muestras y esquema de la Figura. Nota: para obtener un resultado más confiable se recomienda procesar las muestras al menos por duplicado.
4. Cubrir la placa e incubar a temperatura ambiente (20-25°C) con agitación orbital suave durante 1 hora.	
5. Lavar 4 veces con 200 µl de Solución de lavado 1X por pocillo.	Ver ítem-Preparación de reactivos en el instructivo del fabricante. Nota: Retirar el líquido completamente después de cada lavado por volcado y golpeando la placa sobre material absorbente o aspiración con pipeta. Evitar que las placas se sequen entre los lavados y antes de agregar el siguiente reactivo.
6. Agregar 100 µl del Conjugado correspondiente a cada pocillo.	Ver ítem-Preparación de conjugados en el instructivo del fabricante, y el esquema de la Figura para la siembra. Cubrir la placa e incubar a temperatura ambiente (20-25°C) con agitación orbital suave durante 1 hora.
7. Repetir el paso 5.	
8. Agregar 100 µl de Solución sustrato-cromógeno en cada pocillo e incubar con agitación orbital suave durante 10 minutos (±1 minuto) a temperatura ambiente (20-25°C) y en oscuridad (por ejemplo, cubrir la placa con papel aluminio).	Comenzar a contar el tiempo luego de llenar el primer pocillo.
9. Detener la reacción agregando 100 µl de Solución de frenado en cada pocillo y mezclar bien y cuidadosamente aplicando ligeros golpes en los bordes de la placa.	La Solución de frenado debe agregarse en el mismo orden y velocidad que la Solución sustrato-cromógeno (ver paso 8).
10. Medir la absorbancia a 450 nm utilizando un espectrofotómetro de placas. Realizar la lectura dentro de los 15 minutos después de haber agregado la solución de frenado.	No es necesario realizar una lectura de blanco.

3. La expresión de resultados, los criterios de validez de la prueba y la interpretación de resultados se describen en el instructivo del fabricante, de acuerdo a cada Kit.

Bibliografía

Melli LJ, Ciocchini AE, Caillava AJ, Vozza N, Chinen I, Rivas M, Feldman MF, Ugalde JE, Comerci DJ. Serogroup-specific bacterial engineered glycoproteins as novel antigenic targets for diagnosis of Shiga toxin-producing-*Escherichia coli*-associated hemolytic-uremic syndrome. J Clin Microbiol. 2015 Feb;53(2):528-38. doi: 10.1128/JCM.02262-14. Epub 2014 Dec 3.

ANEXO I - MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS

- **Medio de transporte Cary Blair**

Composición:

Para 1000 ml

Tioglicolato de sodio	1,5 g
Fosfato disódico	1,1 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Agar	5,0 g
pH final a 25 ºC	8,0 ± 0,5

Preparación:

1. Disolver 12,6 g del polvo en un litro de agua destilada.
2. Calentar a ebullición hasta disolución completa.
3. Dispensar 3 ml del medio en tubos 13/100 con tapa bacteriológica.
4. Esterilizar en autoclave a 121ºC durante 15 minutos.
5. Conservar a 4ºC.

- **Agar MacConkey (MAC)**

Medio selectivo y diferencial empleado para el aislamiento de *Escherichia coli*

Composición:

Para 1000 ml

Peptona	17.0 g
Peptona de proteosa	3.0 g
Lactosa	10.0 g
Sales biliares Nº3	1.5 g
Cloruro de Sodio	5.0 g
Agar	13.5 g
Rojo neutro	0.03 g
Cristal violeta	0.001 g
pH final a 25 ºC	7.1 ± 0,2

Preparación:

1. Resuspender 50.0 g del polvo en un litro de agua destilada.
2. Esterilizar en autoclave a 121ºC durante 15 minutos.
3. Dejar enfriar hasta una temperatura de 50ºC
4. Mezclar para homogenizar el medio
5. Dispensar aproximadamente 20 ml del medio por cada placa.
6. Conservar a 4ºC
7. Secar el agar en un área estéril, antes de usar.

- **Agar MacConkey sorbitol (SMAC)**

Medio selectivo y diferencial empleado para el aislamiento de *Escherichia coli* O157:H7

Composición:

Para 1000 ml

Peptona	20 g
Sorbitol	10 g
Sales biliares Nº3	1,5 g
Cloruro de sodio	5 g
Rojo neutro	0,03 g
Cristal violeta	0,001 g
Agar	15 g
pH final a 25 ºC	7,1 ± 0,2

Preparación:

8. Resuspender 50.0 g del polvo en un litro de agua destilada.
9. Esterilizar en autoclave a 121ºC durante 15 minutos.
10. Dejar enfriar hasta una temperatura de 50ºC
11. Mezclar para homogenizar el medio
12. Dispensar aproximadamente 20 ml del medio por cada placa.
13. Conservar a 4ºC
14. Secar el agar en un área estéril, antes de usar.

Recomendación:

No calentar el medio a ebullición antes de autoclavar. El calentamiento excesivo destruye el sorbitol.

- **Caldo Tripticasa de soja (CTS)**

Medio utilizado para fines generales para el cultivo de microorganismos fastidiosos y no fastidiosos.

Composición:

Para 1000 ml

Triptona	17	g
Soitona	3	g
Dextrosa	2,5	g
Cloruro de sodio	5	g
Fosfato dipotásico	2,5	g
pH final a 25 ºC	7,3 ± 0,2	

Preparación:

1. Disolver 30 g del polvo en un litro de agua destilada.
2. Dispensar el medio de acuerdo al uso.
3. Esterilizar en autoclave a 121ºC durante 15 minutos.
4. Conservar en la heladera.

- **Caldo Tripticasa de soja con cefixime-telurito (CT-CTS)**

Medio selectivo y diferencial empleado para el aislamiento de *Escherichia coli* O157:H7

Composición:

Para 1000 ml

CTS estéril	1000	ml
Cefixima	0,05	mg
Telurito de potasio	2,5	mg

Preparación:

1. Preparar el CTS, esterilizar y dejar enfriar a temperatura ambiente.
2. Agregar cefixima y telurito al medio.
3. Mezclar para homogenizar.
4. Dispensar el medio de acuerdo al uso.
5. Conservar a 4ºC.

- **Agar Tripticasa de soja (TSA)**

Medio utilizado para fines generales para el cultivo de microorganismos fastidiosos y no fastidiosos.

Composición:
Para 1000 ml

Triptona	15 g
Soitona	5 g
Cloruro de sodio	5 g
Agar	15 g
pH final a 25 ºC	7,3 ± 0,2

Preparación:
1. Disolver 40 g del polvo en un litro de agua destilada.
2. Calentar a ebullición hasta disolución completa.
3. Dispensar el medio de acuerdo al uso.
4. Esterilizar en autoclave a 121ºC durante 15 minutos.
5. Conservar a 4ºC.

- **Agar para conservación**

Medio utilizado para conservar microorganismos no fastidiosos.

Composición:
Para 1000 ml

CTS	1000 ml
Agar	8 g

Preparación:
1. Preparar el CTS y agregar el agar.
2. Calentar a ebullición hasta disolución completa.
3. Dispensar el medio de acuerdo al uso.
4. Esterilizar en autoclave a 121ºC durante 15 minutos.
5. Conservar a 4ºC.

Procedimiento:
1. Sembrar el aislamiento en el vial con agar.
2. Incubar a 37º durante 18ºC.
3. Conservar el vial sembrado a 4ºC.
4. Realizar una vez por mes, un repique un nuevo vial para mantener viable al microorganismo.

- **Solución salina buferada estéril (PBS)**

Composición:
<u>Solución concentrada 10X</u>
Para 1000 ml

Cloruro de sodio	80 g
Cloruro de potasio	2 g
Fosfato ácido disódico anhidro (Na_2HPO_4 PM 142,1)	11,5 g
Fosfato diácido monopotásico (KH_2PO_4)	2 g
pH final a 25 ºC	7,3 ± 0,2

<u>Solución de trabajo 1X</u>
Se realiza una dilución 1:10 de la solución concentrada 10X.

Preparación:
1. Disolver los componentes de la solución concentrada 10X en 1000 ml de agua destilada.
2. Esterilizar la solución 10X, en autoclave a 121ºC, durante 15 minutos.
3. Realizar una dilución 1:10 de la solución 10X.
4. Esterilizar la solución 1X, en autoclave a 121ºC, durante 15 minutos.

- **Solución fisiológica**

Composición:
Para 1000 ml

Cloruro de sodio	8,5 g
pH final a 25 ºC	7 ± 0,2

Preparación:
1. Disolver el cloruro de sodio en un litro de agua destilada.
2. Dispensar la solución de acuerdo al uso.
3. Esterilizar en autoclave a 121ºC, durante 15 minutos.

- **Solución fisiológica formolada 1% V/V**

Se utiliza para inactivar cultivos de bacterias

Composición:
Para 100 ml

Solución fisiológica estéril	97,5 ml
Formol 40% V/V	2,5 ml

Preparación:
1. Mezclar 2,5 ml de formol 40% V/V con 97,5 ml de Solución fisiológica estéril.
2. Conservar a temperatura ambiente.

- **Medio de Craigie**

Se utiliza para la estimulación de la movilidad y expresión del antígeno flagelar.

Composición:
Para 1000 ml

Caldo nutritivo	8 g
Extracto de levadura	2 g
Cloruro de sodio	5 g
Nitrato de potasio	1 g
Agar	3 g
pH final a 25 ºC	7,6 ± 0,2

Preparación:
1. Disolver los componentes en un litro de agua destilada.
2. Calentar a ebullición hasta disolución completa.
3. Dispensar 5 ml por tubo de ensayo.
4. Colocar varilla de vidrio central.
5. Esterilizar en autoclave a 121ºC durante 15 minutos.
6. Conservar a 4ºC.

Recomendación:
Se utiliza varilla de vidrio hueca de 0,6 cm de diámetro por 5 cm de largo aproximadamente. El medio debe cubrir la mitad inferior del largo de la varilla, quedando libre el extremo superior.

- **Placas para la prueba de enterohermolisina de EHEC: Agar base sangre triptosa con glóbulos rojos lavados (AGRL) y sin lavar (AGRSL)**

Se emplean placas con agar base sangre triptosa suplementado con 10 mM de cloruro de calcio y 5% de sangre desfibrinada de oveja o carnero, previamente lavada tres veces con solución salina buferada esteril pH 7,2. (AGRL) y como control se emplean placas de agar con 5% de sangre desfibrinada de oveja o carnero, sin lavar y sin el agregado de cloruro de calcio. (AGRSL)

Placa de AGRL

Composición:

Para 25 ml de agar (una placa)

Agar base sangre triptosa (TBAB)	15 ml
Agar TSA	10 ml
Cloruro de calcio 1M	0,15 ml
Glóbulos rojos lavados (GRL) de sangre desfibrinada de oveja o carnero	0,75 ml

Recomendación:

Se debe emplear sangre fresca, de no más de 10 días de extraída.

Preparación de la placa AGRL:

1. Dispensar el medio de TSA en cada placa de Petri y dejar solidificar.
2. Mantener el medio de TBAB a 50ºC.
3. Agregar el Cloruro de calcio al TBAB y homogeneizar.
4. Incorporar el volumen necesario de GRL al TBAB.
5. Mezclar suavemente con movimientos circulares.
6. Agregar el agar TBAB con los GRL en las placas de Petri con TSA.
7. Identificar a las placas como placas de ensayo.
8. Conservar a 4ºC.
9. Utilizar dentro de los 15 días posteriores a su preparación.

Placa de AGRSL

Composición:

Para 15 ml de agar (una placa)

Agar base sangre triptosa (TBAB)	15 ml
Glóbulos rojos sin lavar (GRSL) de sangre desfibrinada de oveja o carnero	0,75 ml

Recomendación:

Se debe emplear sangre fresca, de no más de 10 días de extraída.

Preparación de la placa AGRSL:

1. Mantener el medio de TBAB a 50ºC.
2. Incorporar el volumen necesario de GRSL al TBAB.
3. Mezclar suavemente con movimientos circulares.
4. Dispensar el agar TBAB con los GRSL en las placas de Petri.
5. Identificar a las placas como placas controles.
6. Conservar a 4ºC.
7. Utilizar dentro de los 15 días posteriores a su preparación.

Preparación de los componentes de las placas de AGRL y AGRSL

- **TBAB**

Composición:
Para 1000 ml

Triptosa	10 g
Extracto de carne	3 g
Cloruro de sodio	5 g
Agar	15 g

Preparación:

1. Disolver los componentes en un litro de agua destilada.
2. Calentar a ebullición hasta disolución completa.
3. Esterilizar en autoclave a 121ºC durante 15 minutos.
4. Dejar enfriar.
5. Mantener en baño de agua termoestatizado a 50ºC para la preparación de las placas de AGRL y AGRSL

Recomendación:
Se puede utilizar el Agar base sangre triptosa de Difco.

- **Cloruro de calcio 1M**

Composición:
Para 10 ml
Cloruro de calcio 1,11 g

Preparación:

1. Disolver el cloruro de calcio en 10 ml de agua destilada.
2. Esterilizar con unidad filtrante de 0,22 µm.
3. Conservar el cloruro de calcio 1M a temperatura ambiente para la preparación de la placa de AGRL

- **Obtención de GRL de sangre desfibrinada de oveja o carnero.**

Preparación:

1. Centrifugar 5 ml de sangre desfibrinada de oveja o carnero a 2500 rpm por 10 minutos.
2. Desechar el plasma
3. Resuspender suavemente con micropipeta, 1 volumen de glóbulos rojos en 2 volúmenes de solución salina buferada estéril pH 7.2. Se debe obtener una suspensión homogénea sin romper los glóbulos rojos.
4. Centrifugar a 2500 rpm por 10 minutos.
5. Repetir 2 veces los pasos 2, 3 y 4.
6. Desechar el sobrenadante.
7. Guardar el paquete globular para la preparación de la placa AGRL

- **Obtención de GRSL de sangre desfibrinada de oveja o carnero.**

Preparación:

1. Centrifugar 5 ml de sangre desfibrinada de oveja o carnero a 2500 rpm por 10 minutos.
2. Desechar el plasma.
3. Guardar el paquete globular para la preparación de la placa AGRSL

- **Medio agar hierro tres azúcares (TSI)**

Composición:
Para 1000 ml:

Peptona	20	g
Cloruro de sodio	5	g
Lactosa	10	g
Sacarosa	10	g
Glucosa	1	g
Sulfato amónico ferroso	0,2	g
Tiosulfato de sodio	0,2	g
Rojo de fenol	0,025	g
Agar	13	g
pH final a 25 ºC	7,3 ± 0,2	

Preparación:
1. Resuspender 65 g del polvo en un litro de agua destilada.
2. Calentar a ebullición hasta disolución completa.
3. Fraccionar 4 o 5 ml del medio en tubos 13/100 con tapa bacteriológica.
4. Esterilizar en autoclave a 121ºC durante 15 minutos.
5. Solidificar en forma de pico de flauta para obtener 2 cámaras de reacción: fondo de 1 cm (anaerobiosis); pico (aerobiosis).

- **Agar citrato de Simmons**

Composición:
Para 1000 ml

Fosfato diácido de amonio	1	g
Fosfato dipotásico	1	g
Cloruro de sodio	5	g
Sulfato de magnesio	0,2	g
Agar	15	g
Azul de bromotimol	0,08	g
Citrato de sodio	5	g
pH final a 25 ºC	6,8 ± 0,2	

Preparación:
1. Resuspender 24,2 g del polvo en un litro de agua destilada.
2. Calentar a ebullición hasta disolución completa.
3. Fraccionar 4 o 5 ml del medio en tubos 13/100 con tapa bacteriológica.
4. Esterilizar en autoclave a 121ºC durante 15 minutos.
5. Solidificar en forma de pico de flauta permitiendo la formación de una base profunda

- **Medio para sulfuro, indol, movilidad (SIM)**

Composición:
Para 1000 ml

Tripteína	20	g
Peptona	6,1	g
Sulfato de hierro y amonio	0,2	g
Tiosulfato sódico	0,2	g
Agar	3,5	g
pH final a 25 ºC	7,3 ± 0,2	

Preparación:
1. Resuspender 30 g del polvo en un litro de agua destilada.
2. Calentar a ebullición hasta disolución completa.
3. Fraccionar 4 o 5 ml del medio en tubos 13/100 con tapa bacteriológica.
4. Esterilizar en autoclave a 121ºC durante 15 minutos.
5. Solidificar en posición vertical.

- **Medio para movilidad indol ornitina (MIO)**

Composición:

Para 1000 ml

Extracto de levadura	3	g
Peptona	10	g
Triptona	10	g
Hidrocloruro de L-ornitina	5	g
Dextrosa	1	g
Agar	2	g
Púrpura de bromocresol	0,02	g
pH final a 25 ºC	6,5 ± 0,2	

Preparación:
1. Resuspender 31 g del polvo en un litro de agua destilada.
2. Calentar a ebullición hasta disolución completa.
3. Fraccionar 4 o 5 ml del medio en tubos 13/100 con tapa bacteriológica.
4. Esterilizar en autoclave a 121ºC durante 15 minutos.
5. Solidificar en posición vertical.

- **Solución al 1% del hidrato de carbono en el medio base Rojo Fenol**

Solución para la prueba de fermentación de azúcares.

Composición:

Para 10 ml

Medio base Caldo Rojo Fenol estéril	9	ml
Hidrato de carbono 10% estéril	1	ml

Preparación:
1. Disolver 1 ml del hidrato de carbono 10 % en 9 ml de caldo Rojo Fenol estéril.
2. Fraccionar 1 ml de la solución en tubos estériles 13/100 con tapa bacteriológica.
3. Conservar los tubos a 4ºC.

- **Caldo Rojo Fenol**

Medio base para la fermentación de azucares

Composición:

Para 1000 ml

Digerido pancreático de caseína	10	g
Cloruro de sodio	5	g
Rojo fenol	0,018	g
Ph final:	7,0 ± 0,2	

Preparación:
1. Disolver 15 g del polvo en 1 litro de agua destilada.
2. Dispensar el medio de acuerdo al uso.
3. Esterilizar en autoclave a 121ºC durante 15 minutos.
4. Conservar en heladera.

- **Solución del hidrato de carbono (10% p/v)**

Composición:
Para 10 ml

Hidrato de carbono	1 g

Preparación:
1. Disolver el hidrato de carbono en 10 ml de agua destilada estéril.
2. Esterilizar con unidad filtrante de 0,22 μm.
3. Conservar en heladera.

Recomendación:
La solución de dulcitol al 10% debe ser utilizada inmediatamente antes de su uso, dado que precipita el hidrato de carbono a 4ºC.

- **Lisina Hierro Agar (LIA)**

Composición:

Peptona	5	g
Extracto de levadura	3	g
Dextrosa	1	g
Hidrocloruro de lisina-L	10	g
Citrato amónico férrico	0,5	g
Tiosulfato de sodio	0,04	g
Púrpura de bromocresol	0,02	g
Agar	15	g
pH final a 25 ºC	6,7 ± 0,2	

Preparación:
1. Resuspender 34,5 g del polvo en un litro de agua destilada.
2. Calentar a ebullición hasta disolución completa.
3. Fraccionar 4 o 5 ml del medio en tubos 13/100 con tapa bacteriológica.
4. Esterilizar en autoclave a 121ºC durante 15 minutos.
5. Solidificar en forma de pico de flauta permitiendo la formación de una base profunda.

- **Agar Mueller Hinton (MH)**

Composición:
Para 1000 ml

Infusión de carne	300	g
Casaminoácidos	17,5	g
Almidón	1,5	g
Agar	17	g
pH final a 25 ºC	7,2 ± 0,2	

Preparación:

1. Resuspender 38 g del polvo en un litro de agua destilada.
2. Esterilizar en autoclave a 121ºC durante 15 minutos.
3. Dejar enfriar hasta una temperatura de 50ºC
4. Dispensar 25 ml del medio por cada placa para obtener una capa de 4 mm de espesor.
5. Conservar a 4ºC. Las placas así conservadas pueden utilizarse hasta 4 días después de su preparación.

ANEXO II - REFERENCIAS

1. Abe CM, Knutton S, Pedroso MZ, *et al.* An enteroaggregative *Escherichia coli* strain of serotype O111:H12 and invades cultured T84 cells and human colonic mucosa. FEMS Microbiol Lett. 2001; 203:199-205.
2. Abe CM, Trabulsi LR, Blanco J, *et al.* Virulence features of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* identified by the *eae*(+) EAF-negative *stx*(-) genetic profile. Diagn Microbiol Infect Dis. 2009; 64(4):357-65.
3. Adachi JA, Jiang ZD, Mathewson JJ, *et al.* Enteroaggregative *Escherichia coli* as a major etiologic agent in traveler's diarrhea in 3 regions of the world. Clin Infect Dis. 2001;32:1706-9.
4. Afset JE, Bevanger L, Romundstad P, *et al.* Association of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) with prolonged diarrhoea. J Med Microbiol. 2004;53(Pt 11):1137-44.
5. Andrade JR, Da Veiga VF, De Santa Rosa MR, *et al.* An endocytic process in HEp-2 cells induced by enteropathogenic *Escherichia coli*. J Med Microbiol. 1989;28(1):49-57.
6. Aranda KR, Fabbricotti SH, Fagundes-Neto U, *et al.* Single multiplex assay to identify simultaneously enteropathogenic, enteroaggregative, enterotoxigenic, enteroinvasive and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains in Brazilian children. FEMS Microbiol Lett. 2007; 267(2):145-50.
7. Araujo JM, Tabarelli GF, Aranda KR, *et al.* Typical enteroaggregative and atypical enteropathogenic types of *Escherichia coli* are the most prevalent diarrhea-associated pathotypes among Brazilian children. J Clin Microbiol. 2007;45(10):3396-9.
8. Baldwin TJ, Knutton S, Sellers L, *et al.* Enteroaggregative *Escherichia coli* strains secrete a heat-labile toxin antigenically related to *E. coli* hemolysin. Infect Immun. 1992; 60:2092-5.
9. Barret TJ, Lior H, Green JH, Khakhria R, Wells JG, Bell BP, *et al*. Laboratory investigation of a multistate food-borne outbrake of *Escherichia coli* O157:H7 by using pulsed-field gel electrophoresis and phage typing. J Clin Microbiol 1994; 32: 3013-7.
10. Baudry B, Savarino SJ, Vial P, *et al.* A sensitive and specific DNA probe to identify enteroaggregative *Escherichia coli*, a recently discovered diarrheal pathogen. J Infect Dis. 1990;16:1249-51.
11. Baumler AJ, Tsolis RM, Heffron F. Contribution of fimbrial operons to attachment to and invasion of epithelial cell lines by *Salmonella typhimurium*. Infect Immun. 1996;64(5):1862-5.
12. Benjamin P, Federman M, Wanke CA. Characterization of an invasive phenotype associated with enteroaggregative *Escherichia coli*. Infect Immun. 1995;63: 3417-21.
13. Bentancor A, Rumi MV, Carbonari C, Gerhardt E, Larzábal M, Vilte DA, *et al*. Virulence profile of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from dogs and cats and genetic relationships with isolates from cattle, meat and humans. Vet Microbiol 2012; 156: 336-42.

14. Bernardini ML, Mounier J, d'Hauteville H, Coquis-Rondon M, Sansonetti PJ. Identification of icsA, a plasmid locus of *Shigella flexneri* which governs bacterial intra- and intercellular spread through interaction with F-actin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1989; 86:3867-71.
15. Bernier C, Gounon P, Le Bouguenec C. Identification of an aggregative adhesion fimbria (AAF) type III-encoding operon in enteroaggregative *Escherichia coli* as a sensitive probe for detecting the AAF-encoding operon family. Infect Immun. 2002;70: 4302-11.
16. Beutin L, Geier D, Steinrück H, Zimmermann S, Scheutz F. Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-like toxin)-producing *Eschericha coli* in seven different species of healthy domestic animals. J Clin Microbiol 1993; 31: 2483-8.
17. Beutin L, Gleier K, Kontny I, Echeverrias P, Scheutz F. Origin and characteristics of enteroinvasive strains of *Escherichia coli* (EIEC) isolated in Germany. Epidemiol Infect. 1997; 118: 199-205.
18. Bieber D, Ramer SW, Wu CY, *et al.* Type IV pili, transient bacterial aggregates, and virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*. Science. 1998; 280(5372):2114-8.
19. Bielaszewska M, Middendorf B, Kock R, *et al.* Shiga toxin-negative attaching and effacing *Escherichia coli*: distinct clinical associations with bacterial phylogeny and virulence traits and inferred in-host pathogen evolution. Clin Infect Dis. 2008; 47(2):208-17.
20. Blake PA, Ramos S, MacDonald KL, *et al.* Pathogen-specific risk factors and protective factors for acute diarrheal disease in urban Brazilian infants. J Infect Dis. 1993; 167(3):627-32.
21. Blanco M, Blanco JE, Dahbi G, *et al.* Identification of two new intimin types in atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. Int Microbiol. 2006; 9(2):103-10.
22. Blocker A, Jouihri N, Larquet E, *et al.* Structure and composition of the *Shigella flexneri* "needle complex", a part of its type III secreton. Mol Microbiol. 2001; 39(3):652-63.
23. Boedeker E. Enteroadherent (enteropathogenic) *Escherichia coli*. London: Chapman and Hall; 1988.
24. Boesman-Finkelstein MF, Finkelstein RA. Antimicrobial effects of human milk: inhibitory effect on enteric pathogens. FEMS Microbiol Lett. 1985; 27:167-74.
25. Boisen N, Struve C, Scheutz F, *et al.* New adhesin of enteroaggregative *Escherichia coli* related to the Afa/Dr/AAF family. Infect Immun. 2008; 76:3281-92.
26. Bourgeois AL, Gardiner CH, Thornton SA, *et al.* Etiology of acute diarrhea among United States military personnel deployed to South America and West Africa. Am J Trop Med Hyg. 1993; 48:243-8.
27. Bouzari S, Jafari A, Zarepour M. Distribution of virulence related genes among enteroaggregative *Escherichia coli* isolates: using multiplex PCR and hybridization. Infect Genet Evol. 2005; 5:79-83.
28. Brandon LD, Goehring N, Janakiraman A, Yan AW, Wu T, .Beckwith J, Goldberg MB. IcsA, a polarly localized autotransporterwith an atypical signal peptide, uses the Sec apparatus for secretion,although the Sec apparatus is circumferentially distributed. Mol. Microbiol. 2003; 50:45-60.

29. Bray J. Isolation of antigenically homogeneous strains of *Bacterium coli neopolitanum* from summer diarrhoea of infants. J Pathol Bacteriol. 1945; 57:239-47.
30. Bueris V, Sircili MP, Taddei CR, *et al.* Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* from children with and without diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007;102(7):839-44.
31. Bustamante VH, Santana FJ, Calva E, *et al.* Transcriptional regulation of type III secretion genes in enteropathogenic *Escherichia coli*: Ler antagonizes H-NS-dependent repression. Mol Microbiol. 2001; 39 (3):664-78.
32. Calderwood SB, Acheson DWK, Keusch GT, Barrett TJ, Griffin PM, Strockbine NA, et al. Proposed new nomenclature for SLT (VT) family. ASM News 1996; 62: 118-9.
33. Campos LC, Franzolin MR, Trabulsi LR. Diarrheagenic *Escherichia coli* categories among the traditional enteropathogenic *E. coli* O serogroups--a review. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2004;99(6):545-52.
34. Carbonare CB, Carbonare SB, Carneiro-Sampaio MM. Early acquisition of serum and saliva antibodies reactive to enteropathogenic *Escherichia coli* virulence-associated proteins by infants living in an endemic area. Pediatr Allergy Immunol. 2003; 14(3):222-8.
35. Carbonari CC, Chinen I, Michelacci V, Campos J, Morabito S, Rivas M. Analysis of draft whole-genome sequences of novel EAEC-Stx strains using ARIES. 10th International Symposium on Shiga Toxin (Verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* infections (VTEC2018). Florencia, Italia: 6-9 de mayo de 2018.
36. Chart H, Smith HR, Rowe B. Enteroaggregative strains of *Escherichia coli* belonging to serotypes O126:H27 and O44:H18 express antigenically similar 18 kDa outer membrane-associated proteins. FEMS Microbiol Lett. 1995; 132:17-22.
37. Chaudhuri RR, Sebaihia M, Hobman JL, *et al.* Complete genome sequence and comparative metabolic profiling of the prototypical enteroaggregative *Escherichia coli* strain 042. PLoS One;5:e8801.
38. Cheasty T, Rowe B. Antigenic relationships between the enteroinvasive *Escherichia coli* O antigens O28ac,O112ac, O124, O136, O143, O144, O152 and O164 and *Shigella* O antigens. J Clin Microbiol 1983; 17: 681-4.
39. Chen HD, Frankel G. Enteropathogenic *Escherichia coli*: unravelling pathogenesis. FEMS Microbiol Rev. 2005; 29(1):83-98.
40. Chinen I, Otero JL, Miliwebsky E, Roldán Ml, Chillemi GM, Baschkier A, *et al*. Characterization of Shiga-producing *Escherichia coli* O157:H7 isolated from calves in Argentina. Res Vet Sci 2003; 74: 283-6.
41. Chinen I, Rivas M, Caffer MI, Cinto RO, Binsztein N. Diagnosis of entero-invasive *Escherichia coli* associated with diarrhea. Rev Argent Microbiol. 1993; 25(1):27-35.

42. Chinen I, Terragno R, Baschkier A, Bruno S, Rivas M. Diagnostico diferencial de cepas de *Escherichia coli* enteroinvasiva por pruebas bioquímicas y moleculares. Presentación Poster. Congreso Argentino de Microbiología. Còrdoba. 2007
43. Clausen CR, Christie DL. Chronic diarrhea in infants caused by adherent enteropathogenic *Escherichia coli*. J Pediatr. 1982; 100(3):358-61.
44. Cleary J, Lai LC, Shaw RK, *et al.* Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adhesion to intestinal epithelial cells: role of bundle-forming pili (BFP), EspA filaments and intimin. Microbiology. 2004;150(Pt 3):527-38.
45. Cohen MB, Nataro JP, Bernstein DI, *et al.* Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in acute childhood enteritis: a prospective controlled study. J Pediatr. 2005; 146(1):54-61.
46. Comité de Nefrología. Incidencia del Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) en la República Argentina. Arch Arg Pediatr 1995; 93: 407-11.
47. Cornelis GR. The type III secretion injectisome. Nat Rev Microbiol. 2006;4(11):811-25.
48. Crane JK, McNamara BP, Donnenberg MS. Role of EspF in host cell death induced by enteropathogenic *Escherichia coli*. Cell Microbiol. 2001; 3(4):197-211.
49. Cravioto A, Reyes RE, Ortega R, *et al.* Prospective study of diarrhoeal disease in a cohort of rural Mexican children: incidence and isolated pathogens during the first two years of life. Epidemiol Infect. 1988;101(1):123-34.
50. Cravioto A, Tello A, Navarro A, *et al.* Association of *Escherichia coli* HEp-2 adherence patterns with type and duration of diarrhoea. Lancet. 1991; 337:262-4.
51. Cravioto A, Tello A, Villafan H, *et al.* Inhibition of localized adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells by immunoglobulin and oligosaccharide fractions of human colostrum and breast milk. J Infect Dis. 1991;163(6):1247-55.
52. Croxen MA, Finlay BB. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. Nat Rev Microbiol. 2010;8(1):26-38.
53. Czeczulin JR, Balepur S, Hicks S, *et al.* Aggregative adherence fimbria II, a second fimbrial antigen mediating aggregative adherence in enteroaggregative *Escherichia coli*. Infect Immun. 1997;65: 4135-45.
54. Czeczulin JR, Whittam TS, Henderson IR, *et al.* Phylogenetic analysis of enteroaggregative and diffusely adherent *Escherichia coli*. Infect Immun. 1999; 67:2692-9.
55. Dean P, Kenny B. Intestinal barrier dysfunction by enteropathogenic *Escherichia coli* is mediated by two effector molecules and a bacterial surface protein. Mol Microbiol. 2004;54(3):665-75.
56. Dean P, Kenny B. The effector repertoire of enteropathogenic *E. coli*: ganging up on the host cell. Curr Opin Microbiol. 2009;12(1):101-9.

57. Dean P, Maresca M, Kenny B. EPEC's weapons of mass subversion. Curr Opin Microbiol. 2005;8(1):28-34.
58. Dean P, Muhlen S, Quitard S, *et al.* The bacterial effectors EspG and EspG2 induce a destructive calpain activity that is kept in check by the co-delivered Tir effector. Cell Microbiol. 2010 Mar 25.
59. Debroy C, Bright, B.D., Wilson, R.A., Yealy, J., Kumar, R. and Bahn, M.K. Plasmid-coded DNA fragment developed as a specific gene probe for identification of enteroaggregative *Escherichia coli*. Journal of Medical Microbiology. 1994a; 41: 393-8.
60. Debroy C, Yealy J, Wilson RA, *et al.* Antibodies raised against the outer membrane protein interrupt adherence of enteroaggregative *Escherichia coli*. Infect Immun. 1995;63:2873-9.
61. Deng W, Puente JL, Gruenheid S, *et al.* Dissecting virulence: systematic and functional analyses of a pathogenicity island. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004;101(10):3597-602.
62. Donnenberg MS, Tacket CO, James SP, *et al.* Role of the *eaeA* gene in experimental enteropathogenic *Escherichia coli* infection. J Clin Invest. 1993;92(3):1412-7.
63. Doughty S, Sloan J, Bennet-Wood V, Robertson M, Robins-Browen RM, Hartland EL. Identification of a nobel fimbrial gene cluster related to long polar fimbriae in locus of enterocyte effacement- negative strains of enterohemorrhagic *Escherichia coli.* Infect Immun 2002; 70: 6761-9.
64. Dudley EG, Abe C, Ghigo JM, *et al.* An IncI1 plasmid contributes to the adherence of the atypical enteroaggregative *Escherichia coli* strain C1096 to cultured cells and abiotic surfaces. Infect Immun. 2006;74:2102-14.
65. Dudley EG, Thomson NR, Parkhill J, *et al.* Proteomic and microarray characterization of the AggR regulon identifies a pheU pathogenicity island in enteroaggregative *Escherichia coli*. Mol Microbiol. 2006;61:1267-82.
66. Dulguer MV, Fabbricotti SH, Bando SY, *et al.* Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains: phenotypic and genetic profiling reveals a strong association between enteroaggregative *E. coli* heat-stable enterotoxin and diarrhea. J Infect Dis.2003;188(11):1685-94.
67. DuPont HL, Ericsson CD, Farthing MJ, *et al*. Expert review of the evidence base for prevention of travelers' diarrhea. J Travel Med. 2009;16:149-60.
68. Durno C, R. Soni R, Sherman P. 1989. Adherence of vero cytotoxinproducing *Escherichia coli* serotype O157:H7 to isolated epithelial cells and brush border membranes in vitro: role of type 1 fimbriae (pili) as a bacterial adhesin expressed by strain CL-49. Clin. Invest. Med. 12:194-200.
69. Echeverria P, Serichantalerg O, Changchawalit S et al. Tissue culture-adherent *Escherichia coli* in infant diarrhoea. Journal of Infectious Diseases. 1992; 165:141-3.

70. Egile C, Loisel TP, Laurent V, Li R, Pantaloni D, Sansonetti PJ, Carlier MF.. Activation of the CDC42 effector N-WASP by the *Shigella flexneri* IcsA protein promotes actin nucleation by Arp2/3 complexand bacterial actin-based motility. J. Cell Biol. 1999; 146:1319-1332.
71. Elias WP, Barros SF, Moreira CG, *et al.* Enteroaggregative *Escherichia coli* strains among classical enteropathogenic *Escherichia coli* O serogroups. J Clin Microbiol. 2002;40(9):3540-1.
72. Elias WP, Jr, Czeczulin JR, Henderson IR, *et al.* Organization of biogenesis genes for aggregative adherence fimbria II defines a virulence gene cluster in enteroaggregative *Escherichia coli*. J Bacteriol. 1999;181:1779-85.
73. Elliott SJ, Sperandio V, Giron JA, *et al.* The locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator controls expression of both LEE- and non-LEE-encoded virulence factors in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Infect Immun.2000;68(11):6115-26.
74. Elliott SJ, Wainwright LA, McDaniel TK, *et al.* The complete sequence of the locus of enterocyte effacement (LEE) from enteropathogenic *Escherichia coli* E2348/69. Mol Microbiol. 1998;28(1):1-4.
75. Eslava C, Navarro-Garcia F, Czeczulin JR, *et al.* Pet, an autotransporter enterotoxin from enteroaggregative *Escherichia coli*. Infect Immun. 1998;66:3155-63.
76. Estrada-Garcia T, Cerna JF, Paheco-Gil L, *et al.* Drug-resistant diarrheogenic *Escherichia coli*, Mexico. Emerg Infect Dis. 2005;11(8):1306-8.
77. Evans DG, Olarte J, DuPont HL, *et al*. Enteropathogens associated with pediatric diarrhea in Mexico City. J Pediatr. 1977;91:65-8.
78. Fagundes-Neto U, Scaletsky IC. The gut at war: the consequences of enteropathogenic *Escherichia coli* infection as a factor of diarrhea and malnutrition. Sao Paulo Med J. 2000;118(1):21-9.
79. Fang GD, Lima AA, Martins CV, *et al.* Etiology and epidemiology of persistent diarrhea in northeastern Brazil: a hospitalbased, prospective, case-control study. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 1995;21:137-44.
80. Farmer JJ, Davis BR, Hickman-Brenner FW, McWhorter A, Huntley-Carter GP, Asbury MA, Riddle C, Wathen-Grady HG, Elias C, Fanning GR, Steigerwalt AG, OHara CM, Morris GK, Smith PB, Brenner DJ, Biochemical identification of new species and biogroups of enterobacteriaceae isolated from clinical specimens,J. Clin. Microbiol. 21 (1985) 46-76.
81. Fasano A, Noriega FR, Liao FM, *et al.* Effect of shigella enterotoxin 1 (ShET1) on rabbit intestine *in vitro* and in vivo. Gut. 1997;40:505-11.
82. Fasano A, Noriega FR, Maneval DR, Jr, *et al.* Shigella enterotoxin 1: an enterotoxin of *Shigella flexneri* 2a active in rabbit small intestine *in vivo* and in vitro. J Clin Invest. 1995;95:2853-61.
83. Faundez G, Figueroa G, Troncoso M, Cabello FB.Characterization of enteroinvasive *Escherichia coli* strains isolated from children with diarrhea in Chile. J Clin Microbiol 1988; 26: 928-32.

84. Ferguson WW, June RC. Experiments on feeding adult volunteers with *Escherichia coli* 111, B4, a coliform organism associated with infant diarrhea. Am J Hyg. 1952;55(2):155-69.
85. Frankel G, Candy DC, Everest P, *et al.* Characterization of the C-terminal domains of intimin-like proteins of enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, and *Hafnia alvei*. Infect Immun. 1994;62(5):1835-42.
86. Frankel G, Phillips A.D, Trabulsi L.R, Knutton S, Dougan G, Matthews S.E. Intimin and the host cell-is it bound to end in Tir(S)?. Trends Microbiol. 2001; 9:214-218.
87. Franzolin MR, Alves RC, Keller R, *et al.* Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in children with diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2005;100(4):359-63.
88. Galan JE, Wolf-Watz H. Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines. Nature. 2006;444(7119):567-73.
89. Garmendia J, Frankel G, Crepin VF. Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections: translocation, translocation, translocation. Infect Immun. 2005;73(5):2573-85.
90. Gasser C, Gautier E, Steck A, Siebenmann RE, Oechslin R. Hemolytic-uremic syndrome: bilateral necrosis of the renal cortex in acute acquired hemolytic anemia. Schweiz Med Wochenschr 1955; 85(38-39): 905-9.
91. Giannella RA. *E. coli* heat-stable enterotoxins; guanylins, and their receptors: what are they and what do they do? J Lab Clin Med. 1995;125:173-181.
92. Gill DM, Richardson SH. Adenosine diphosphate-ribosylation of adenylate cyclase catalyzed by heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli*: comparison with cholera toxin. J Infect Dis. 1980;141:64-70.
93. Gill RK, Borthakur A, Hodges K, *et al.* Mechanism underlying inhibition of intestinal apical Cl/OH exchange following infection with enteropathogenic *E. coli*. J Clin Invest. 2007;117(2):428-37.
94. Gioppo NM, Elias WP, Jr, Vidotto MC, *et al.* Prevalence of HEp-2 cell-adherent *Escherichia coli* and characterisation of enteroaggregative *E. coli* and chain-like adherent *E. coli* isolated from children with and without diarrhoea, in Londrina, Brazil. FEMS Microbiol Lett. 2000;190:293-8.
95. Giron JA, Donnenberg MS, Martin WC, *et al.* Distribution of the bundle-forming pilus structural gene (*bfpA*) among enteropathogenic *Escherichia coli*. J Infect Dis. 1993;168(4):1037-41.
96. Giron JA, Ho AS, Schoolnik GK. An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. Science. 1991;254(5032):710-3.
97. Glandt M, Adachi JA, Mathewson JJ, *et al.* Enteroaggregative *Escherichia coli* as a cause of traveler's diarrhea: clinical response to ciprofloxacin. Clin Infect Dis. 1999;29:335-8.
98. Goldberg MB, Barzu O, Parsot C, Sansonetti PJ. Unipolar localization and ATPase activity of IcsA, a *Shigella flexneri* protein involved in intracellular movement. Infect. Agents Dis. 1993; 2:210-1.
99. Gomes TA, Irino K, Girao DM, *et al.* Emerging enteropathogenic *Escherichia coli* strains? Emerg Infect Dis. 2004;10(10):1851-5.

100. Gomes TA, Vieira MA, Abe CM, *et al.* Adherence patterns and adherence-related DNA sequences in *Escherichia coli* isolates from children with and without diarrhea in Sao Paulo city, Brazil. J Clin Microbiol. 1998;36:3609-13.

101. Gomes TA, Vieira MA, Wachsmuth IK, *et al.* Serotype-specific prevalence of *Escherichia coli* strains with EPEC adherence factor genes in infants with and without diarrhea in Sao Paulo, Brazil. J Infect Dis. 1989;160(1):131-5.

102. Gomez-Duarte OG, Arzuza O, Urbina D, *et al.* Detection of *Escherichia coli* enteropathogens by multiplex polymerase chain reaction from children's diarrheal stools in two Caribbean-Colombian cities. Foodborne Pathog Dis. 7:199-206.

103. Gomez-Duarte OG, Kaper JB. A plasmid-encoded regulatory region activates chromosomal *eaeA* expression in enteropathogenic *Escherichia coli*. Infect Immun. 1995;63(5):1767-76.

104. Gordillo ME, Reeve GR, Pappas J, Mathewson JJ, DuPont HL, Murray BE.. Molecular characterization of strains of enteroinvasive *Escherichia coli* O143, including isolates from a large outbreak in Houston, Texas. J. Clin. Microbiol. 1992; 30:889-93.

105. Greenberg RN, Hill M, Crytzer J, *et al.* Comparison of effects of uroguanylin, guanylin, and *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin STa in mouse intestine and kidney: evidence that uroguanylin is an intestinal natriuretic hormone. J Investig Med. 1997;45:276-82.

106. 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.

107. Gross RJ, Rowe B, Threlfall EJ. *Escherichia coli* 0142.H6; a drug-resistant enteropathogenic clone? J Hyg (Lond). 1985;94(2):181-91.

108. Guandalini S, Rao MC, Smith PL, *et al*. cGMP modulation of ileal ion transport: in vitro effects of *Escherichia coli* heatstable enterotoxin. Am J Physiol. 1982;243:G36-41.

109. Guth BEC, Prado V, Rivas M. Shiga toxin-producing *Escherichia coli.* En: Torres AG editor. Pathogenic *Escherichia coli* in Latin America. Sharjah, United Arab Emirates, Bentham Science Publishers Ltd., 2010, p 65-83.

110. Gyles CL. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: An overview. J Anim Sci 2007; 85: E45-62.

111. Haider K, Faruque SM, Shahid NS, *et al.* Enteroaggregative *Escherichia coli* infections in Bangladeshi children: clinical and microbiological features. J Diarrhoeal Dis Res. 1991;9:318-22.

112. Harrington SM, Dudley EG, Nataro JP. Pathogenesis of enteroaggregative Escherichia coli infection. FEMS Microbiol Lett. 2006;254:12-8.

113. Harris JR, Mariano J, Wells JG, Payne BS, Donnel HD, Cohen ML.. Person-to-person transmission in an outbreak of enteroinvasive *Escherichia coli*. Am. J. Epidemiol. 1985; 122: 245-52.

114. Hartland E. L, Batcherlor M, Delahay R. M, Hale C, Matthews S, Dougan G, *et al*. Binding of intimin from enteropathogenic Escherichia coli to Tir and to host cells. Mol. Microbiol. 1999; 32:151-8.
115. Heilmann C, Schweitzer O, Gerke C, *et al.* Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. Mol Microbiol. 1996;20:1083-91.
116. Henderson IR, Czeczulin J, Eslava C, *et al.* Characterization of Pic, a secreted protease of *Shigella flexneri* and enteroaggregative *Escherichia coli*. Infect Immun. 1999;67:5587-96.
117. Hernandes RT, Elias WP, Vieira MA, *et al.* An overview of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. FEMS Microbiol Lett. 2009;297(2):137-49.
118. Hicks S, Candy DC, Phillips AD. Adhesion of enteroaggregative *Escherichia coli* to pediatric intestinal mucosa in vitro. Infect Immun. 1996;64:4751-60.
119. Horne C, Vallance BA, Deng W, *et al.* Current progress in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* vaccines. Expert Rev Vaccines. 2002;1(4):483-93.
120. Huang DB, DuPont HL, Jiang ZD, *et al.* Interleukin-8 response in an intestinal HCT-8 cell line infected with enteroaggregative and enterotoxigenic *Escherichia coli*. Clin Diagn Lab Immunol. 2004;11:548-51.
121. Hueck CJ. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. Microbiol Mol Biol Rev. 1998;62(2):379-433.
122. Hyland RM, Sun J, Griener TP, *et al.* The bundlin pilin protein of enteropathogenic *Escherichia coli* is an Nacetyllactosamine-specific lectin. Cell Microbiol. 2008;10(1):177-87.
123. Iguchi A, Thomson NR, Ogura Y, *et al.* Complete genome sequence and comparative genome analysis of enteropathogenic *Escherichia coli* O127:H6 strain E2348/69. J Bacteriol. 2009;191(1):347-54.
124. Iizumi Y, Sagara H, Kabe Y, *et al.* The enteropathogenic *E. coli* effector EspB facilitates microvillus effacing and antiphagocytosis by inhibiting myosin function. Cell Host Microbe. 2007;2(6):383-92.
125. Itoh Y, Nagano I, Kunishima M, *et al.* Laboratory investigation of enteroaggregative *Escherichia coli* O untypeable:H10 associated with a massive outbreak of gastrointestinal illness. J Clin Microbiol. 1997;35:2546-50.
126. Jarvis KG, Giron JA, Jerse AE, *et al.* Enteropathogenic *Escherichia coli* contains a putative type III secretion system necessary for the export of proteins involved in attaching and effacing lesion formation. Proc Natl Acad Sci USA. 1995;92(17):7996-8000.
127. Jenkins C, Smith HR, Lawson AJ, *et al.* Serotypes, intimin subtypes, and antimicrobial resistance patterns of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* isolated in England from 1993 to 1996. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2006;25(1):19- 24.
128. Jenkis C, Willshaw GA, Evans J, Cheasty T, Chart H, Shaw DJ, *et al.* Subtyping of virulence genes in verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) other than serogrup O157 associated with disease in the United Kingdom. J Med Microbiol 2003; 52: 941-7.

129. Jepson MA, Pellegrin S, Peto L, *et al.* Synergistic roles for the Map and Tir effector molecules in mediating uptake of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) into non-phagocytic cells. Cell Microbiol. 2003;5(11):773-83.
130. Jerse AE, Yu J, Tall BD, *et al.* A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 1990;87(20):7839-43.
131. Jiang ZD, Greenberg D, Nataro JP, *et al.* Rate of occurrence and pathogenic effect of enteroaggregative *Escherichia coli* virulence factors in international travelers. J Clin Microbiol. 2002;40:4185-90.
132. Jiang ZD, Lowe B, Verenkar MP, *et al.* Prevalence of enteric pathogens among international travelers with diarrhea acquired in Kenya (Mombasa), India (Goa), or Jamaica (Montego Bay). J Infect Dis. 2002;185:497-502.
133. Jordan DM, Cornick N, Torres AG, *et al.* Long polar fimbriae contribute to colonization by *Escherichia coli* O157:H7 *in vivo*. Infect Immun. 2004;72(10):6168-71.
134. Jores J, Rumer L, Kiessling S, *et al.* A novel locus of enterocyte effacement (LEE) pathogenicity island inserted at *pheV* in bovine Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strain O103:H2. FEMS Microbiol Lett. 2001;204(1):75-9.
135. June RC, Ferguson WW, Worfel MT. Experiments in feeding adult volunteers with *Escherichia coli* 55, B5, a coliform organism associated with infant diarrhea. Am J Hyg. 1953;57(2):222-36.
136. Kanack KJ, Crawford JA, Tatsuno I, *et al.* SepZ/EspZ is secreted and translocated into HeLa cells by the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion system. Infect Immun. 2005;73(7):4327-37.
137. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*. Nat Rev Microbiol. 2004; 2(2):123-40.
138. Kaper JB. Defining EPEC. Rev Microbiol. 1996; 27(130-3).
139. Kaplan B. Recent advances in the understanding of the pathogenesis of HUS. Pediatr Nephrol 1990; 4: 276-81.
140. Karmali MA, Mascarenhas M, Shen S, Ziebell K, Johnson S, Reid-Smith R, *et al*. Association of genomic Oisland 122 of *Escherichia coli* EDL933 with verocytotoxin- producing *Escherichia coli* seropathotypes that are linked to epidemic and / or serious disease. J Clin Microbiol 2003; 41: 4930-40.
141. Kenny B, DeVinney R, Stein M, *et al.* Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. Cell. 1997;91(4):511-20.
142. Kenny B, Ellis S, Leard AD, *et al.* Co-ordinate regulation of distinct host cell signalling pathways by multifunctional enteropathogenic *Escherichia coli* effector molecules. Mol Microbiol. 2002;44(4):1095-107
143. Kenny B, Jepson M. Targeting of an enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) effector protein to host mitochondria. Cell Microbiol. 2000;2(6):579-90.

144. Kenny B. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC)-- a crafty subversive little bug. Microbiology. 2002;148(Pt 7):1967-78.
145. Keskimäki M, Ikäheimo R, Kärkkäinen P, Scheutz F, Puohiniemi RL, Siitonen A. Shiga toxin producing *Escherichia coli* serotype OX3:H21 causing hemolytic uremic syndrome. Clin Infect Dis 1997; 24: 1278-9.
146. Ketyi I. Epidemiology of the enteroinvasive *Escherichia coli*. Observations in Hungary. J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol. 1989; 33:261-7.
147. Klapproth JM, Sasaki M, Sherman M, *et al. Citrobacter rodentium lifA/efa1* is essential for colonic colonization and crypt cell hyperplasia *in vivo*. Infect Immun. 2005;73(3):1441-51.
148. Klapproth JM, Scaletsky IC, McNamara BP, *et al.* A large toxin from pathogenic *Escherichia coli* strains that inhibits lymphocyte activation. Infect Immun. 2000;68(4):2148-55.
149. Knutton S, Baldwin T, Williams PH, *et al.* Actin accumulation at sites of bacterial adhesion to tissue culture cells: basis of a new diagnostic test for enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Infect Immun. 1989;57(4):1290-8.
150. Knutton S, Shaw RK, Bhan M et al. Ability of enteroaggregative *Escherichia coli* strains to adhere in vitro to human intestinal mucosa. Infection and Immunity. 1992; 60: 2083-91.
151. Konowalchuk J, Speirs JI, Stavric S. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. Infect Immun 1977; 18: 775-9.
152. Kucharzik T, Hudson JT, 3rd, Lugering A, *et al.* Acute induction of human IL-8 production by intestinal epithelium triggers neutrophil infiltration without mucosal injury. Gut. 2005;54:1565-72.
153. Kukuruzovic R, Robins-Browne RM, Anstey NM, *et al.* Enteric pathogens, intestinal permeability and nitric oxide production in acute gastroenteritis. Pediatr Infect Dis J. 2002;21:730-9.
154. Lasaro MA, Rodrigues JF, Mathias-Santos C, et al. Genetic diversity of heat-labile toxin expressed by enterotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from humans. J Bacteriol. 2008;190:2400-10.
155. Law D, Char H. Enteroaggregative *Escherichia coli*. Journal of Applied Microbiology.1998; 84: 685-97.
156. Law, D. Adhesion and its role in the virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*. Clinical Microbiology Reviews. 1994; 7: 152-73.
157. Levine MM, Bergquist EJ, Nalin DR, *et al. Escherichia coli* strains that cause diarrhoea but do not produce heat-labile or heat-stable enterotoxins and are non-invasive. Lancet. 1978;1(8074):1119-22.
158. Levine MM, Edelman R. Enteropathogenic *Escherichia coli* of classic serotypes associated with infant diarrhea: epidemiology and pathogenesis. Epidemiol Rev. 1984;6:31-51.
159. Levine MM, Ferreccio C, Prado V, *et al.* Epidemiologic studies of *Escherichia coli* diarrheal infections in a low socioeconomic level peri-urban community in Santiago, Chile. Am J Epidemiol. 1993;138:849-69.
160. Levine MM, Kaper JB, Black RE, *et al.* New knowledge on pathogenesis of bacterial enteric infections as applied to vaccine development. Microbiol Rev. 1983;47(4):510-50.

161. Levine MM, Nataro JP, Karch H, *et al.* The diarrheal response of humans to some classic serotypes of enteropathogenic *Escherichia coli* is dependent on a plasmid encoding an enteroadhesiveness factor. J Infect Dis. 1985;152(3):550-9.
162. Levine MM. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. J Infect Dis. 1987;155(3):377-89.
163. Lima AA, Guerrant RL. Persistent diarrhea in children: epidemiology, risk factors, pathophysiology, nutritional impact, and management. Epidemiol Rev. 1992;14:222-42.
164. Long K, Vasquez-Garibay E, Mathewson J, *et al*. The impact of infant feeding patterns on infection and diarrheal disease due to enterotoxigenic *Escherichia coli*. Salud Publica Mex. 1999;41:263-70.
165. Ludwig A, von Rhein C, Bauer S, *et al.* Molecular analysis of cytolysin A (ClyA) in pathogenic *Escherichia coli* strains. J Bacteriol 2004;186:5311-20.
166. Madara JL, Patapoff TW, Gillece-Castro B, *et al.* 5'-adenosine monophosphate is the neutrophil-derived paracrine factor that elicits chloride secretion from T84 intestinal epithelial cell monolayers. J Clin Invest. 1993;91:2320-5.
167. Magdalena J, Goldberg MB. Quantification of *Shigella* Ics Arequired for bacterial actin polymerization. Cell Motil. Cytoskeleton 2002; 51:187-96.
168. Makino S, Sasakawa C, Kamata K, Kurata T, Yoshikawa M. A genetic determinant required for continuous reinfection of adjacent cells on large plasmid in *Shigella flexneri* 2a. Cell. 1986; 46:551-555.
169. Manning SD, Motiwala AS, Springman AC, Qi W, Lacher DW, Ouellette LM, *et al*. Variation in virulence among clades of *Escherichia coli* O157:H7 associated with disease outbreaks. Proc Natl Acad Sci USA 2008; 105: 4868-73.
170. Marlovits TC, Stebbins CE. Type III secretion systems shape up as they ship out. Curr Opin Microbiol. 2009;13(1):47-52.
171. Masana MO, D'Astek BA, Palladino PM, Galli L, Del Castillo LL, Carbonari C, *et al*. Genotypic characterization of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef abattoirs of Argentina. J Food Prot 2011; 74(12): 2008-17.
172. Masana MO, Leotta GA, Del Castillo LL, D'Astek BA, Palladino PM, Galli L, *et al.* Prevalence, characterization, and genotypic analysis of *Escherichia coli* O157:H7/NM from selected beef exporting abattoirs of Argentina. J Food Prot 2010; 73: 649-56.
173. Mathewson JJ, Cravioto A. HEp-2 cell adherence as an assay for virulence among diarrheagenic *Escherichia coli*. J Infect Dis. 1989;159:1057-60.

174. Mathewson JJ, Jiang ZD, Zumla A, *et al.* HEp-2 cell-adherent *Escherichia coli* in patients with human immunodeficiency virus-associated diarrhea. J Infect Dis. 1995;171:1636-9.
175. Mathewson JJ, Johnson PC, DuPont HL, *et al.* A newly recognized cause of travelers' diarrhea: enteroadherent *Escherichia coli*. J Infect Dis. 1985;151:471-5.
176. Mathewson JJ, Oberhelman RA, Dupont HL, *et al.* Enteroadherent *Escherichia coli* as a cause of diarrhea among children in Mexico. J Clin Microbiol. 1987;25:1917-9.
177. Matsuzawa T, Kuwae A, Yoshida S, *et al.* Enteropathogenic *Escherichia coli* activates the RhoA signaling pathway via the stimulation of GEF-H1. Embo J. 2004;23(17):3570-82.
178. McNamara BP, Koutsouris A, O'Connell CB, *et al.* Translocated EspF protein from enteropathogenic *Escherichia coli* disrupts host intestinal barrier function. J Clin Invest. 2001;107(5):621-9.
179. Mead PS, Griffin PM. *Escherichia coli* O157:H7. Lancet 1998; 352: 1207-12.
180. Meichtri L, Miliwebsky E, Gioffré A, Chinen I, Baschkier A, Chillemi G, Guth BEC, *et al*. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in healthy young beef steers from Argentina: prevalence and virulence properties. Int J Food Microbiol 2004; 96: 189-98.
181. Melli LJ, Ciocchini AE, Caillava AJ, Vozza N, Chinen I, Rivas M, Feldman MF, Ugalde JE, Comerci DJ. Serogroup-specific bacterial engineered glycoproteins as novel antigenic targets for diagnosis of Shiga toxin-producing-Escherichia coli-associated hemolytic-uremic syndrome. J Clin Microbiol. 2015 Feb;53(2):528-38. doi: 10.1128/JCM.02262-14. Epub 2014 Dec 3.
182. Mellies JL, Barron AM, Carmona AM. Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* virulence gene regulation. Infect Immun. 2007;75(9):4199-210.
183. Mellies JL, Navarro-Garcia F, Okeke I, *et al. espC* pathogenicity island of enteropathogenic *Escherichia coli* encodes an enterotoxin. Infect Immun. 2001;69(1):315-24.
184. Mellor GE, Sima EM, Barlowa RS, D'Astek BA, Galli L, Chinen I, *et al*. Phylogenetically related Argentinean and Australian *Escherichia coli* O157 are distinguished by virulence clades and alternative Shiga toxin 1 and 2 prophages. Appl Environ Microbiol 2012; 78: 4724-31.
185. Menard R, Prevost MC, Gounonp P. Sansonetti P, Dehio C..The secreted Ipa complex of *Shigella flexneri* promotes entry into mammaliancells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1996; 93:1254-8.
186. Menard R, Sansonetti P, Parsot C, Vasselon T. Extracellular association and cytoplasmic partitioning of the IpaB and IpaC invasins of *S. flexneri*. Cell. 1994; 79:515-25.
187. Menard R, Sansonetti PJ, Parsot C. Nonpolar mutagenesis of the ipa genes defines IpaB, IpaC, and IpaD as effectors of *Shigella flexneri* entry into epithelial cells. J. Bacteriol. 1993; 175:5899-5906.
188. Miliotis MD, Koornhof HJ, Phillips JI. Invasive potential of noncytotoxic enteropathogenic *Escherichia coli* in an *in vitro* Henle 407 cell model. Infect Immun. 1989;57(7):1928-35.

189. Mohamed JA, DuPont HL, Jiang ZD, *et al*. A novel single-nucleotide polymorphism in the lactoferrin gene is associated with susceptibility to diarrhea in North American travelers to Mexico. Clin Infect Dis. 2007;44:945-52.
190. Monteiro-Neto V, Bando SY, Moreira-Filho CA, *et al.* Characterization of an outer membrane protein associated with haemagglutination and adhesive properties of enteroaggregative *Escherichia coli* O111:H12. Cell Microbiol. 2003;5:533-47.
191. Mueller CA, Broz P, Cornelis GR. The type III secretion system tip complex and translocon. Mol Microbiol. 2008;68(5):1085-95.
192. Mueller CA, Broz P, Muller SA, *et al.* The V-antigen of *Yersinia* forms a distinct structure at the tip of injectisome needles. Science. 2005;310(5748):674-6.
193. Mueller M, Grauschopf U, Maier T, *et al.* The structure of a cytolytic alpha-helical toxin pore reveals its assembly mechanism. Nature. 2009;459:726-30.
194. Muller D, Greune L, Heusipp G, *et al.* Identification of unconventional intestinal pathogenic *Escherichia coli* isolates expressing intermediate virulence factor profiles by using a novel single-step multiplex PCR. Appl Environ Microbiol. 2007;73(10):3380-90.
195. Nara JM, Cianciarullo AM, Culler HF, *et al.* Differentiation of typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* using colony immunoblot for detection of bundle-forming pilus expression. J Appl Microbiol. 2010;109(1):35–43.
196. Nataro JP, Baldini MM, Kaper JB, *et al.* Detection of an adherence factor of enteropathogenic *Escherichia coli* with a DNA probe. J Infect Dis. 1985;152(3):560-5.
197. Nataro JP, Deng Y, Cookson S, *et al.* Heterogeneity of enteroaggregative *Escherichia coli* virulence demonstrated in volunteers. J Infect Dis. 1995;171:465-8.
198. Nataro JP, Deng Y, Maneval DR, *et al.* Aggregative adherence fimbriae I of enteroaggregative *Escherichia coli* mediate adherence to HEp-2 cells and hemagglutination of human erythrocytes. Infect Immun. 1992;60:2297-304.
199. Nataro JP, Hicks S, Phillips AD, *et al.* T84 cells in culture as a model for enteroaggregative *Escherichia coli* pathogenesis. Infect Immun. 1996;64:4761-8.
200. Nataro JP, Kaper JB, Robins-Browne R, *et al.* Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells.Pediatr Infect Dis J. 1987;6:829-31.
201. Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev. 1998;11(1):142-201.
202. Navarro-Garcia F, Eslava C, Villaseca JM, *et al. In vitro* effects of a high-molecular-weight heat-labile enterotoxin from enteroaggregative *Escherichia coli*. Infect Immun.1998;66:3149-54.
203. Neter E, Westphal O, Luderitz O, *et al.* Demonstration of antibodies against enteropathogenic *Escherichia coli* in sera of children of various ages. Pediatrics. 1955;16(6):801-8.

204. Nicholls L, Grant TH, Robins-Browne RM. Identification of a nobel genetic locus that is required for in vitro adhesion of a clinical isolated of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* to epithelial cells. Mol Microbiol 2000; 35: 275-88.
205. Nishikawa Y, Zhou Z, Hase A, Ogasawara J, Cheasty T, Haruki K. Relationship of genetic type of Shiga toxin to manifestation of bloody diarrhea due to enterohemorrhagic *Escherichia coli* serogroup O157 isonlates in Osaka City, Japan. J Clin Microbiol 2000; 38: 2440-2.
206. Nougayrede JP, Donnenberg MS. Enteropathogenic *Escherichia coli* EspF is targeted to mitochondria and is required to initiate the mitochondrial death pathway. Cell Microbiol. 2004;6(11):1097-111.
207. Nougayrede JP, Fernandes PJ, Donnenberg MS. Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to host cells. Cell Microbiol. 2003;5(6):359-72.
208. Nunes EB, Saridakis HO, Irino K, *et al.* Genotypic and phenotypic characterization of attaching and effacing *Escherichia coli* (AEEC) isolated from children with and without diarrhoea in Londrina, Brazil. J Med Microbiol. 2003;52(Pt 6):499-504.
209. O´Brien AD, La Veck GD, Thompson MR, Formal SB. Production of *Shigella dysenteriae* type-1- like cytotoxin by *Escherichia coli*. J Infect Dis 1982; 146, 763-9.
210. Oberhelman RA, Laborde D, Mera R, *et al.* Colonization with enteroadherent, enterotoxigenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* among day-care center attendees in New Orleans, Louisiana. Pediatr Infect Dis J. 1998;17:1159-62.
211. Ochoa TJ, Barletta F, Contreras C, *et al.* New insights into the epidemiology of enteropathogenic *Escherichia coli* infection. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2008;102(9):852-6.
212. Ochoa TJ, Ecker L, Barletta F, *et al*. Age-related susceptibility to infection with diarrheagenic *Escherichia coli* among infants from Periurban areas in Lima, Peru. Clin Infect Dis. 2009;49:1694-702.
213. Okeke IN, Lamikanra A, Czeczulin J, *et al.* Heterogeneous virulence of enteroaggregative *Escherichia coli* strains isolated from children in Southwest Nigeria. J Infect Dis. 2000;181:252-60.
214. Pál T, Pácsa S, Emody L, Vörös S. Antigenic relationship among virulent enteroinvasive *Escherichia coli*, *Shigella flexneri* and *Shigella sonnei* detected by ELISA. Letters to the Editor.1983
215. Palmeira P, Costa-Carvalho BT, Arslanian C, *et al.* Transfer of antibodies across the placenta and in breast milk from mothers on intravenous immunoglobulin. Pediatr Allergy Immunol. 2009;20(6):528-35.
216. Parma AE, Sanz ME, Blanco JE, Blanco J, Blanco M, Padola NL, *et al.* Virulence genotypes and serotypes of verotoxigenic *Escherichia coli* isolated from cattle and foods in Argentina. Eur J Epidemiol 2000; 16: 757-62.
217. Parsot C. Shigella spp. and enteroinvasive Escherichia coli pathogenicity factors. FEMS Microbiol. Letters Mini Rev. 2005; 252: 11-8.

218. Pass MA, Odedra R, Batt RM. Multiplex PCRs for identification of *Escherichia coli* virulence genes. J. Clin. Microbiol. 2000; 38:2001-2004.
219. Patel SK, Dotson J, Allen KP, *et al*. Identification and molecular characterization of EatA, an autotransporter protein of enterotoxigenic *Escherichia coli*. Infect Immun. 2004;72:1786-94.
220. Paton AW, Srimanote P, Woodrow MC, Paton JC. Characterization of Saa, a novel autoagglutinating adhesin produced by locus of enterocyte effacement-negative Shiga-toxigenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans. Infect Immun 2001; 69: 6999-7009.
221. Paton AW, Woodrow MC, Doyle RM, Lanser JA, Paton JC. Molecular characterization of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* O113:H21 strain lacking *eae* responsible for a cluster of cases of hemolytic-uremic syndrome. J Clin Microbiol 1999; 37: 3357-61.
222. Pedroso MZ, Freymuller E, Trabulsi LR, *et al.* Attaching-effacing lesions and intracellular penetration in HeLa cells and human duodenal mucosa by two *Escherichia coli* strains not belonging to the classical enteropathogenic *E. coli* serogroups. Infect Immun. 1993;61(3):1152-6.
223. Peralta-Ramirez J, Hernandez JM, Manning-Cela R, *et al.* EspF Interacts with nucleation-promoting factors to recruit junctional proteins into pedestals for pedestal maturation and disruption of paracellular permeability. Infect Immun. 2008;76(9):3854-68.
224. Pereira AC, Britto-Filho JD, de Carvalho J, *et al.* Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) strains enter and survive within cultured intestinal epithelial cells. Microb Pathog. 2008;45:310-4.
225. Phillips AD, Frankel G. Intimin-mediated tissue specificity in enteropathogenic *Escherichia coli* interaction with human intestinal organ cultures. J Infect Dis. 2000;181(4):1496-500.
226. Pianciola L, Chinen I, Mazzeo M, et al. Genotypic characterization of *Escherichia coli* O157:H7 strains that cause diarrhea and hemolytic uremic syndrome in Neuquén, Argentina. Int J Med Microbiol 2014;304:499-504.
227. Pianciola L, D'Astek BA, Mazzeo M, et al. Genetic features of human and bovine *Escherichia coli* O157:H7 strains isolated in Argentina. Int J Med Microbiol 2016;306:123-30.
228. Polotsky YE, Dragunskaya EM, Seliverstova VG, *et al.* Pathogenic effect of enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Escherichia coli* causing infantile diarrhoea. Acta Microbiol Acad Sci Hung. 1977;24(3):221-36.
229. Porter ME, Mitchell P, Roe AJ, *et al.* Direct and indirect transcriptional activation of virulence genes by an AraC-like protein, PerA from enteropathogenic *Escherichia coli*. Mol Microbiol. 2004;54(4):1117-33.
230. Puente JL, Finlay BB. Pathogenic *Escherichia coli*. In E. A. Groisman (ed.). Principles of bacterial pathogenesis. AcademicPress, San Diego, Calif. 2001; p. 387-457.
231. Quitard S, Dean P, Maresca M, *et al.* The enteropathogenic *Escherichia coli* EspF effector molecule inhibits PI-3 kinasemediated uptake independently of mitochondrial targeting. Cell Microbiol. 2006;8(6):972-81.

232. Rajakumar K, Sasakawa C, Adler B. Use of a novel approach, termed island probing, identifies the *Shigella flexneri* she pathogenicity island which encodes a homolog of the immunoglobulin A protease-like family of proteins. Infect Immun.1997;65:4606-14.

233. Ramos HC, Rumbo M, Sirard JC. Bacterial flagellins: mediators of pathogenicity and host immune responses in mucosa. Trends Microbiol. 2004;12(11):509-17.

234. Regua-Mangia AH, Gomes TA, Vieira MA, *et al.* Frequency and characteristics of diarrhoeagenic *Escherichia coli* strains isolated from children with and without diarrhoea in Rio de Janeiro, Brazil. J Infect. 2004;48(2):161-7.

235. Rendon MA, Saldana Z, Erdem AL, *et al.* Commensal and pathogenic *Escherichia coli* use a common pilus adherence factor for epithelial cell colonization. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007;104(25):10637-42.

236. Riley LW, Remis RS, Helgerson SD, McGee HB, Wells JG, Davis BR, *et al.* Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* O157:H7 serotype. N Engl J Med 1983; 308: 681-5.

237. Robins-Browne RM. Traditional enteropathogenic *Escherichia coli* of infantile diarrhea. Rev Infect Dis. 1987;9(1):28-53.

238. Rockabrand DM, Shaheen HI, Khalil SB, *et al*. Enterotoxigenic *Escherichia coli* colonization factor types collected from 1997 to 2001 in US military personnel during operation Bright Star in northern Egypt. Diagn Microbiol Infect Dis.92 *Pathogenic Escherichia coli in Latin America Flores and Okhuysen*2006;55:9-12.

239. Rodrigues J, Scaletsky IC, Campos LC, *et al.* Clonal structure and virulence factors in strains of *Escherichia coli* of the classic serogroup O55. Infect Immun. 1996;64(7):2680-6.

240. Roe AJ, Tysall L, Dransfield T, *et al.* Analysis of the expression, regulation and export of NleA-E in *Escherichia coli* O157: H7. Microbiology. 2007;153(Pt 5):1350-60.

241. Rowe PC, Orbine E, Wells OA, McLaine PN. Epidemiology of hemolytic-uremic syndrome in Canadian children from 1986 to 1988. The Canadian Pediatric Kidney Disease Reference Centre. J Pediatr 1991; 119: 218-24.

242. Ruiting L, Reeves PR. *Escherichia coli* in disguise: molecular origins of *Shigella.* Review Microbes and Infection2002; 4: 1125-32.

243. Ruttler ME, Renna NF, Balbi L, *et al.* Characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* strains isolated from children with acute diarrhea, in Mendoza, Argentina. Rev Argent Microbiol. 2002;34:167-70.

244. Sack RB, Gorbach SL, Banwell JG, *et al*. Enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from patients with severe cholera-like disease. J Infect Dis. 1971;123:378-85.

245. Samie A, Obi CL, Dillingham R, *et al.* Enteroaggregative *Escherichia coli* in Venda, South Africa: distribution of virulence-related genes by multiplex polymerase chain reaction in stool samples of human

immunodeficiency virus (HIV)- positive and HIV-negative individuals and primary school children. Am J Trop Med Hyg. 2007;77:142-50.

246. Samie A, Obi CL, Franasiak J, *et al.* PCR detection of *Clostridium difficile* triose phosphate isomerase (tpi), toxin A (tcdA), toxin B (tcdB), binary toxin (cdtA, cdtB), and tcdC genes in Vhembe District, South Africa. Am J Trop Med Hyg. 2008;78:577-85.
247. Sansonetti PJ, Egile C, Wenneras C. Shigellosis: from disease symptoms to molecular and cellular pathogenesis,. In E. A.Groisman (ed.), Principles of bacterial pathogenesis. Academic Press, San Diego, Calif. 2000; p. 355-87.
248. Savarino S.J., McVeigh, A., Watson, J. et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin is not restricted to enteroaggregative E. coli. Journal of Infectious Diseases. 1996; 173:1019-1022.
249. Savarino SJ, Fasano A, Watson J, *et al.* Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 represents another subfamily of *E. coli* heat-stable toxin. Proc Natl Acad Sci USA. 1993;90:3093-7.
250. Scaletsky IC, Fabbricotti SH, Silva SO, *et al.* HEp-2-adherent *Escherichia coli* strains associated with acute infantile diarrhea, Sao Paulo, Brazil. Emerg Infect Dis. 2002;8:855-8.
251. Scaletsky IC, Silva ML, Trabulsi LR. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. Infect Immun. 1984;45(2):534-6.
252. Scaletsky, I. C. A., S. H. Fabbricotti, K. R. Aranda, M. B. Morais, and U.Fagundes-Neto. Comparison of DNA hybridization and PCR assaysfor detection of putative pathogenic enteroadherent *Escherichia coli*. J. Clin.Microbiol. 2002; 40:1254-8.
253. Scheutz F, Møller Nielsen E, Frimodt-Møller J, Boisen N, Morabito S, Tozzoli R, *et al.* Characteristics of the enteroaggregative Shiga toxin/verotoxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 strain causing the outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, May to June 2011. Euro Surveill 2011; 16(24): pii=19889. [On-line] http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19889.
254. Scheutz F, Teel LD, Beutin L, Piérard D, Buvens G, Karch H, *et al.* A multi-center evaluation 1 of a sequence-based protocol to subtype Shiga toxins and standardize Stx2 nomenclature. J Clin Microbiol 2012; 50(9): 2951-63.
255. 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: 1055-61.
256. Schmidt H, Knop C, Franke S, Aleksic S, Heesemann J and Karch H. Development of PCR for screening of enteroaggregative *Escherichia coli*. Journal of Clinical Microbiology. 1995; 33: 701–705.
257. Schubert S, Rakin A, Karch H, *et al.* Prevalence of the "high-pathogenicity island" of Yersinia species among *Escherichia coli* strains that are pathogenic to humans. Infect Immun. 1998;66:480-5.
258. Schulz S, Green C, Yuen P, *et al*. Guanylyl cyclase is a heat stable toxin receptor. Cell. 1990;63:941-948.

259. Scotland SM, Willshaw GA, Smith HR, Said B, Stokes N, Rowe B. Virulence properties of *Escherichia coli* strains belonging to serogroups O26, O55, O111 and O128 isolated inthe United Kingdom in 1991 from patients with diarrhoea. Epidemiology and Infection. 1993; 111: 429-38.
260. Sekiya K, Ohishi M, Ogino T, *et al.* Supermolecular structure of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion system and its direct interaction with the EspA-sheath-like structure. Proc Natl Acad Sci USA. 2001;98(20):11638-43.
261. Senerwa D, Mutanda LN, Gathuma JM, *et al.* Antimicrobial resistance of enteropathogenic *Escherichia coli* strains from a nosocomial outbreak in Kenya. Apmis. 1991;99(8):728-34.
262. Sereny B. Experimental keratoconjunctivitis shigellosa Sereny B. Experimental keratoconjunctivitis shigellosa. Acta Microbiol Acad Sci Hung 1957; 4: 367-6.
263. Sethabutr O, Venkatesan M, Murphy GS, Eampokalap B, Hoge CW, Echeverria P. Detection of *Shigella* e and enteroinvasive *E. coli* by ampli®cation of the invasionplasmid antigen H DNA sequence in patients withdysentery. J Infect Dis 1993; 167: 458-61.
264. Shah N, DuPont HL, Ramsey DJ. Global etiology of travelers' diarrhea: systematic review from 1973 to the present. Am J Trop Med Hyg. 2009;80:609-14.
265. Shaw RK, Cleary J, Murphy MS, *et al.* Interaction of enteropathogenic *Escherichia coli* with human intestinal mucosa: role of effector proteins in brush border remodeling and formation of attaching and effacing lesions. Infect Immun. 2005;73(2):1243-51.
266. Shaw RK, Smollett K, Cleary J, *et al.* Enteropathogenic *Escherichia coli* type III effectors EspG and EspG2 disrupt the microtubule network of intestinal epithelial cells. Infect Immun. 2005;73(7):4385-90.
267. Sheikh J, Czeczulin JR, Harrington S, *et al.* A novel dispersin protein in enteroaggregative *Escherichia coli*. J Clin Invest. 2002;110:1329-37.
268. Sheikh J, Hicks S, Dall'Agnol M, *et al.* Roles for Fis and YafK in biofilm formation by enteroaggregative *Escherichia coli*. Mol Microbiol. 2001;41:983-97.
269. Silva ML, Giampaglia CM. Colostrum and human milk inhibit localized adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. Acta Paediatr. 1992;81(3):266-7.
270. Silva RS,Toledo MRF,Trabulsi LR. Biochemical and Cultural Characteristics of Invasive *Escherichia coli*.J Clin Microbiol. 1980;11(5):441-4.
271. Simi S, Pelosi-Teixeira E, Yamada AT, Joazeiro PP, Catani CF, Yano T. 2002. Hemagglutinating factor (HAF) associated with adhesiveness in enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC). Microbiol. Immunol. 2002; 46:359-63.
272. Skoudy A, Mounier J, Aruffo A, Ohayon H, Gounon P, Sansonetti P, Tran Van Nhieu G. CD44 binds to the *Shigella* IpaB protein andparticipates in bacterial invasion of epithelial cells. Cell. Microbiol. 2000; 2:19-33.

273. Skoudy A, Nhieu GT, Mantis N, Arpin M, Mounier J, Gounon P, Sansonetti P. A functional role for ezrin during *Shigella flexneri* entry into epithelial cells. J. Cell Sci. 1999; 112:2059-68.
274. Small PL, Falkow S. Identification of regions on a 230-kilobase plasmid from enteroinvasive *Escherichia coli* that are required for entry into HEp-2 cells. Infect. Immun. 1988; 56:225-9.
275. Smith HR, Cheasty T, Rowe B. Enteroaggregative *Escherichia coli* and outbreaks of gastroenteritis in UK. Lancet. 1997;350:814-5.
276. Sobel J, Gomes TA, Ramos RT, *et al.* Pathogen-specific risk factors and protective factors for acute diarrheal illness in children aged 12-59 months in Sao Paulo, Brazil. Clin Infect Dis. 2004;38(11):1545-51.
277. Sohel I, Puente JL, Ramer SW, *et al.* Enteropathogenic *Escherichia coli*: identification of a gene cluster coding for bundleforming pilus morphogenesis. J Bacteriol. 1996;178(9):2613-28.
278. Spizzirri FD, Rahman RC, Bibiloni N, Ruscasso JD, Amoreo OR. Childhood hemolytic uremic syndrome in Argentina: long-term follow-up and prognostic features. Pediatr Nephrol 1997; 11: 156-60.
279. Stein M, Kenny B, Stein MA, *et al.* Characterization of EspC, a 110-kilodalton protein secreted by enteropathogenic *Escherichia coli* which is homologous to members of the immunoglobulin A protease-like family of secreted proteins. J Bacteriol. 1996;178(22):6546-54.
280. Steiner TS, Nataro JP, Poteet-Smith CE, *et al.* Enteroaggregative *Escherichia coli* expresses a novel flagellin that causes IL-8 release from intestinal epithelial cells. J Clin Invest. 2000;105:1769-77.
281. Stone KD, Zhang HZ, Carlson LK, *et al.* A cluster of fourteen genes from enteropathogenic *Escherichia coli* is sufficient for the biogenesis of a type IV pilus. Mol Microbiol. 1996;20(2):325-37.
282. Suzart S, Guth BE, Pedroso MZ, *et al.* Diversity of surface structures and virulence genetic markers among enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) strains with and without the EAEC DNA probe sequence. FEMS Microbiol Lett. 2001;201:163-8.
283. Swerdlow DL, Griffin PM. Duration of faecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 among children in day-care centres. Lancet 1997; 349: 745-6.
284. Tacket CO, Reid RH, Boedeker EC, *et al*. Enteral [10] Wenneras C, Erling V. Prevalence of enterotoxigenic *Escherichia coli*-associated diarrhoea and carrier state in the developing world. J Health Popul Nutr. 2004;22:370-82.
285. Tarr P. *Escherichia coli* O157:H7: Clinical, diagnostic and epidemiological aspects of human infections. Clin Infect Dis 1995; 20: 1-10.
286. Tatsuno I, Horie M, Abe H, Miki T, Makino K, Shinagawa H, *et al*. *tox*B gene on pO157 of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 is required for full epithelial cell adherence phenotype. Infect Immun 2001; 69: 6660-9.

287. Tatsuno I, Mundy R, Frankel G, *et al.* The *lpf* gene cluster for long polar fimbriae is not involved in adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* or virulence of *Citrobacter rodentium*. Infect Immun. 2006;74(1):265-72.
288. Taylor CJ, Hart A, Batt RM, *et al.* Ultrastructural and biochemical changes in human jejunal mucosa associated with enteropathogenic *Escherichia coli* (0111) infection. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 1986;5(1):70-3.
289. Taylor DN, Echeverria P, Sethabutr O, Pitarangi C, Leksomboon U, Blacklow N, Rowe B, Gross R, Cross J. Clinical and microbiologic features of *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* infections detected by DNA hybridization. J. Clin. Microbiol. 1988; 26:1362-6.
290. Taylor KA, O'Connell CB, Luther PW, *et al.* The EspB protein of enteropathogenic *Escherichia coli* is targeted to the cytoplasm of infected HeLa cells. Infect Immun. 1998;66(11):5501-7.
291. Thoren A. The role of enteropathogenic *E. coli* in infantile diarrhoea. Aspects on bacteriology, epidemiology and therapy. Scand J Infect Dis Suppl. 1983;37:1-51.
292. Tikhomirov E. WHO programme for the control of hospital infections. Chemioterapia. 1987;6(3):148-51.
293. Tobe T, Sasakawa C. Role of bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli* in host cell adherence and in microcolony development. Cell Microbiol. 2001;3(9):579-85.
294. Toledo MR, Alvariza Mdo C, Murahovschi J, *et al.* Enteropathogenic *Escherichia coli* serotypes and endemic diarrhea in infants. Infect Immun. 1983;39(2):586-9.
295. Toledo MRF, Trabulsi LR. Correlation between biochemicaland serological characteristics of *Escherichia coli* and results of the Sere!ny test. J Clin Microbiol1983; 17: 419±21.
296. Toma C, Lu Y, Higa N, Nakasone N, Chinen I, Baschkier A, Rivas M, Iwanaga M. Multiplex PCR Assay for Identification of Human Diarrheagenic *Escherichia coli*. J. Clin. Microbiol. 2003; 41:2669-71.
297. Torres AG, Giron JA, Perna NT, Burland V, Blattner FR, Avelino-Flores F, *et al.* Identification and characterization of *lpf*ABCC´DE, a fimbrial opreron of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. Infect Immun 2002; 70: 5416-27.
298. Torres AG, Zhou X, Kaper JB. Adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* strains to epithelial cells. Infect Immun. 2005;73(1):18-29.
299. Trabulsi LR, Keller R, Tardelli Gomes TA. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. Emerg Infect Dis. 2002;8(5):508-13.
300. Tran Van Nhieu G, Ben-Ze'ev A, Sansonetti PJ.. Modulation of bacterial entry into epithelial cells by association between vinculin andthe *Shigella* IpaA invasin. EMBO J. 1997; 16:2717-29.
301. Tu X, Nisan I, Yona C, *et al.* EspH, a new cytoskeleton-modulating effector of enterohaemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*. Mol Microbiol. 2003;47(3):595-606.

302. Turner SM, Scott-Tucker A, Cooper LM, *et al*. Weapons of mass destruction: virulence factors of the global killer enterotoxigenic *Escherichia coli*. FEMS Microbiol Lett. 2006,263:10-20.
303. Tzipori S, Montanaro J, Robins-Browne RM, *et al.* Studies with enteroaggregative *Escherichia coli* in the gnotobiotic piglet gastroenteritis model. Infect Immun. 1992;60:5302-6.
304. Uber AP, Trabulsi LR, Irino K, *et al.* Enteroaggregative *Escherichia coli* from humans and animals differ in major phenotypical traits and virulence genes. FEMS Microbiol Lett. 2006;256:251-7.
305. Ulshen MH, Rollo JL. Pathogenesis of *Escherichia coli* gastroenteritis in man--another mechanism. N Engl J Med. 1980;302(2):99-101.
306. Varela G, Aguirre A, Carrillo J. *Escherichia coli-gomez* nueva especie aislada de un caso mortal de diarrea. Bol Med Hosp Infant Mex. 1946;3(3).
307. Velarde JJ, Varney KM, Inman KG, *et al.* Solution structure of the novel dispersin protein of enteroaggregative *Escherichia coli*. Mol Microbiol. 2007;66:1123-35.
308. Vial PA, Robins-Browne R, Lior H, *et al.* Characterization of enteroadherent-aggregative *Escherichia coli*, a putative agent of diarrheal disease. J Infect Dis. 1988;158:70-9.
309. Vidal JE, Navarro-Garcia F. EspC translocation into epithelial cells by enteropathogenic *Escherichia coli* requires a concerted participation of type V and III secretion systems. Cell Microbiol. 2008;10(10):1975-86.
310. Vidal RM, Valenzuela P, Baker K, *et al*. Characterization of the most prevalent colonization factor antigens present in Chilean clinical enterotoxigenic *Escherichia coli* strains using a new multiplex polymerase chain reaction. Diagn Microbiol Infect Dis. 2009;65:217-23.
311. Vieira MA, Andrade JR, Trabulsi LR, *et al.* Phenotypic and genotypic characteristics of *Escherichia coli* strains of nonenteropathogenic *E. coli* (EPEC) serogroups that carry *eae* and lack the EPEC adherence factor and Shiga toxin DNA probe sequences. J Infect Dis. 2001;183(5):762-72.
312. Wagner A, Wiedermann U. Travellers' diarrhoea - pros and cons of different prophylactic measures. Wien Klin Wochenschr. 2009;121Suppl3:13-8.
313. Wai SN, Takade A, Amako K. The hydrophobic surface protein layer of enteroaggregative *Escherichia coli* strains. FEMS Microbiol Lett. 1996;135:17-22.
314. Wanke CA, Schorling JB, Barrett LJ, *et al.* Potential role of adherence traits of *Escherichia coli* in persistent diarrhea in an urban Brazilian slum. Pediatr Infect Dis J. 1991;10:746-51.
315. Watanabe H, Wada A, Inagaki Y, Itoh K, Tamura K. Outbreaks of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 infection by two different genotype strains in Japan. Lancet 1996; 348: 81-2.
316. Watarai M, Funato S, Sasakawa C. Interaction of Ipa proteinsof *Shigella flexneri* with alpha5beta1 integrin promotes entry of the bacteria into mammalian cells. J. Exp Med. 1996; 183:991-9.

317. Weintraub A. Enteroaggregative *Escherichia coli*: epidemiology, virulence and detection. J Med Microbiol. 2007;56:4-8.
318. Wolf MK. Occurrence, distribution and associations of O and H serogroups colonization factor antigens and toxins of enterotoxigenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev. 1997; 10:569-584
319. World Health Organization (WHO). Prevention and control of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) infections. Report of a WHO Consultation. World Health Organization, Geneva, 1997.
320. Yamamoto T, Koyama, Y, Matsumoto M. et al. Localized, aggregative, and diffuse adherence to HeLa cells, plastic and human small intestines by *Escherichia coli* isolated from patients with diarrhea. Journal of Infectious Diseases. 1992; 166: 1295–310.
321. Yamamoto T, Wakisaka N, Nakae T. A novel cryohemagglutinin associated with adherence of enteroaggregative *Escherichia coli*. Infect Immun. 1997;65:3478-84.
322. Yen YT, Kostakioti M, Henderson IR, *et al.* Common themes and variations in serine protease autotransporters. Trends Microbiol. 2008;16(8):370-9.
323. Yuichiro T, Hiroshi N, Tamoko M, et al. The relationship between O-antigens and pathogenic genes of diarrea-associated *Escherichia coli*. Jpn J Infect Dis. 2005; 58: 65-9.
324. Zamboni A, Fabbricotti SH, Fagundes-Neto U, *et al.* Enteroaggregative *Escherichia coli* virulence factors are found to be associated with infantile diarrhea in Brazil. J Clin Microbiol. 2004;42:1058-63.
325. Zhang WL, Kohler B, Oswald E, *et al.* Genetic diversity of intimin genes of attaching and effacing *Escherichia coli* strains. J Clin Microbiol. 2002;40(12):4486-92.