

Universidad Nacional de San Martín

Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas “Carlos G. Malbrán”

Maestría en Microbiología Molecular. 8va Cohorte.

Trabajo de Tesis realizado como requisito para optar al título de

MAGISTER EN MICROBIOLOGÍA MOLECULAR

Detección y caracterización de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga en niños atendidos en un Hospital Pediátrico de la ciudad de La Plata.

Autor: Bioq. Ricardo Sebastián Oderiz

Director: Dra. Lucia Galli

Co-Director: Dr. Gerardo Leotta

Tesis realizada en el Laboratorio de Microbiología de los Alimentos, Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata (LaMA-FCV-UNLP).

Miembros del Jurado: Dra. Marta Rivas, Mgter. Luis Pianciola y Dr. Horacio Repetto.

La Plata, Buenos Aires, Argentina

Mayo de 2016

Dedicado a mis amores: Martiniano, Josefina y Alejandra

AGRADECIMIENTOS

Deseo manifestar mi agradecimiento y reconocimiento público a todas las personas que contribuyeron de una manera u otra en la realización del presente trabajo.

El primer agradecimiento es para Silvina Giugno y Blanca Gatti, por brindarme toda su confianza y apoyo en el armado del Laboratorio de Microbiología Molecular del Hospital de Niños de La Plata, además de alentarme a realizar la Maestría.

También quiero agradecer a mis compañeras del Hospital que cubrieron mi ausencia cuando estaba en el Malbrán o en la Facultad: Marisa Bettiol, Cecilia Vescina, Juliana Palau y Florencia Gil.

Agradezco la cordialidad y colaboración brindada por las doctoras Elizabeth Miliwebsky, Isabel Chinen y Marta Rivas, responsables del Laboratorio Nacional de Referencia para Síndrome Urémico Hemolítico y diarreas sanguinolentas y referentes Nacionales de Laboratorio de las Unidades Centinela de SUH.

Agradezco a la Dra. Nora Lía Padola y su equipo de trabajo por la colaboración brindada en la serotipificación de los aislamientos de STEC.

Por supuesto quiero agradecer a Gerardo Leotta, por invitarme a realizar el presente trabajo en el Laboratorio de Microbiología de los Alimentos de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP, además de brindarme su calidez humana y haber participado activamente en el desarrollo del presente trabajo. Extiendo el agradecimiento a Victoria Brusa, Alejandra Londero, Luciano Linares y Emanuel Ortega por su cordialidad y compañerismo.

Mi gratitud, en forma especial, es para la Directora de ésta Tesis, Dra. Lucia Galli, por brindarme dedicación y tiempo, aportando sus conocimientos y participando activamente en la elaboración del presente trabajo.

TABLA DE CONTENIDOS

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------|----|
| ÍNDICE DE FIGURAS..... | 7 |
| ÍNDICE DE TABLAS..... | 8 |
| RESUMEN..... | 9 |
| INTRODUCCIÓN..... | 10 |
| 1. Enfermedad diarreica aguda..... | 10 |
| 1.1. <i>Escherichia coli</i> | 11 |
| 1.2. <i>Escherichia coli</i> patógenos para el hombre..... | 12 |
| 1.3. <i>Escherichia coli</i> productor de toxina Shiga..... | 12 |
| 1.4. Reservorios de STEC..... | 15 |
| 1.5. Fuentes y vías de transmisión de STEC..... | 16 |
| 1.6. Presentación clínica de las infecciones por STEC..... | 19 |
| 1.6.1. Síndrome urémico hemolítico..... | 21 |
| 1.6.2. Epidemiología des SUH y situación en Argentina..... | 22 |
| 1.6.3. Uso de antimicrobianos y STEC. Tratamiento del SUH..... | 24 |
| 1.7. Principales marcadores de virulencia de STEC..... | 25 |
| 1.7.1. Toxinas Shiga..... | 25 |
| 1.7.2. Otras toxinas (SubAB, CDT-V y EAST1)..... | 27 |
| 1.7.3. Factores de adherencia intestinal..... | 28 |
| 1.7.3.1. Intimina y región LEE..... | 29 |
| 1.7.3.2. Adhesinas codificadas fuera de la región LEE..... | 31 |
| 1.7.3.2.a. Fimbria polar larga..... | 31 |
| 1.7.3.2.b. Factor para la adherencia de <i>E. coli</i> enterohemorrágico (Efa-1)..... | 32 |
| 1.7.3.2.c. Adhesina homologa a IrgA (Iha)..... | 33 |
| 1.7.3.2.d. Adhesina autoaglutinante de STEC (Saa)..... | 34 |
| 1.7.4. Megaplásmido..... | 34 |
| 1.8-Patogénesis de STEC..... | 35 |
| 1.9-Diagnóstico de la infección por STEC..... | 37 |
| 1.10-Subtipificacion molecular..... | 38 |

2. OBJETIVOS

| | |
|--------------------------------|----|
| 2.1 Objetivo general..... | 40 |
| 2.2 Objetivos específicos..... | 40 |

3. MATERIALES Y MÉTODOS

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.1 Diseño experimental y población estudiada..... | 42 |
| Muestras analizadas..... | 42 |
| Criterios de inclusión..... | 43 |
| Criterios de exclusión..... | 43 |
| 3.2. Plan de trabajo..... | 43 |
| 3.2.1. Cultivo microbiológico primario y aislamiento de STEC..... | 44 |
| 3.2.2. Preparación de las muestras de ADN bacteriano..... | 44 |
| 3.2.3. Detección de STEC mediante tamizaje por PCR múltiple..... | 44 |
| 3.2.4. Aislamiento y conservación de las cepas STEC..... | 45 |
| 3.3. Caracterización fenotípica de los aislamientos de STEC..... | 46 |
| 3.3.1. Identificación bioquímica..... | 46 |
| 3.3.2. Serotipificación de STEC..... | 46 |
| a) Determinación del antígeno somático O..... | 46 |
| b) Determinación del antígeno flagelar H..... | 47 |
| 3.3.3. Sensibilidad antimicrobiana. | 48 |
| 3.3.4. Detección de la producción de toxinas Shiga por enzoinmunoensayo..... | 48 |
| 3.3.5. Caracterización de fenotipo hemolítico..... | 48 |
| 3.4. Caracterización genotípica de los aislamientos de STEC..... | 49 |
| 3.4.1. Preparación de la muestras de ADN..... | 49 |
| 3.4.2. Confirmación genotípica de <i>E. coli</i> O26, O103, O111, O121, O145 y O157..... | 49 |
| 3.4.3. Detección del gen <i>fliC_{H7}</i> | 50 |
| 3.4.4. Detección de los genes <i>ehxA</i> , <i>saa</i> , <i>iha</i> , <i>efa/lifA</i> , <i>toxB</i> , <i>lpfA1</i> , <i>lpfA2</i> , <i>cdt-V</i> , <i>subAB</i> , y <i>astA</i> | 50 |
| 3.4.5. Identificación de subtipos de <i>stx₂</i> por PCR-RFLP..... | 51 |
| 3.4.6. Identificación de subtipos <i>stx_{2b}</i> y <i>stx_{2d}</i> por PCR convencional..... | 52 |
| 3.4.7. Identificación de los subtipos de <i>stx₁</i> por PCR convencional..... | 53 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 3.4.8. Identificación de la variante γ_1 del gen <i>eae</i> | 53 |
| 3.4.8. Detección de los genes <i>aggR</i> y <i>aaiC</i> de <i>E. coli</i> enteroagregativo..... | 54 |
| 3.5. Subtipificación molecular de las cepas de STEC..... | 54 |
| 3.5.1. ERIC-PCR..... | 54 |
| 3.5.2. Electroforesis en gel de campo pulsante..... | 55 |
| 3.5.3. Análisis de los perfiles moleculares..... | 56 |
| 3.5.4. Poder discriminatorio..... | 56 |
| 3.6. Métodos estadísticos..... | 56 |
| 3.7. Aspectos éticos..... | 56 |
| 4. RESULTADOS..... | 58 |
| 5. DISCUSIÓN..... | 71 |
| 6. CONCLUSIONES..... | 84 |
| 7. PERSPECTIVAS A FUTURO..... | 86 |
| 8. BIBLIOGRAFÍA..... | 87 |
| 9. LISTA DE ABREVIATURAS..... | 113 |
| 10. ANEXO 1 (protocolos utilizados)..... | 116 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. Factores probados y postulados involucrados en la transmisión de STEC..... | 17 |
| 2. Organización de la isla de patogenicidad LEE..... | 29 |
| 3. Célula del epitelio intestinal humano mostrando las primeras etapas de la colonización por STEC..... | 37 |
| 4. Distribución de casos con aislamiento de STEC por edad. Periodo 2006-2012..... | 59 |
| 5. Distribución de aislamientos de STEC según diagnóstico por edad. Período 2006-2012..... | 59 |
| 6. Distribución por semana epidemiológica de los casos con aislamiento de STEC..... | 60 |
| 7. Dendograma de la relación genética entre cepas de <i>E. coli</i> O157:H7 estudiadas por ERIC-PCR..... | 69 |
| 8. Dendograma de la relación genética entre cepas de <i>E. coli</i> O157:H7 estudiadas por <i>Xba</i> I-PFGE.... | 70 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. Clasificación de serotipos de STEC en seropatotipos..... | 14 |
| 2. Propuesta molecular para la categorización de STEC (EFSA, 2013)..... | 15 |
| 3. Secuencia de oligonucleótidos utilizados para detección de STEC..... | 45 |
| 4. Secuencia de oligonucleótidos utilizados para confirmación molecular de los serotipos somáticos y presencia del gen <i>eae</i> | 49 |
| 5. Secuencia de oligonucleótidos utilizados para detección del gen <i>fliC_{h7}</i> | 50 |
| 6. Secuencias de oligonucleótidos utilizados para caracterizar genotípicamente los aislamientos de STEC. | 51 |
| 7. Secuencia de oligonucleótidos utilizados para la detección de subtipos de <i>stx₂</i> por PCR-RFLP..... | 52 |
| 8. Tamaños de los fragmentos de restricción obtenidos para cada subtipo de <i>stx₂</i> | 52 |
| 9. Secuencias nucleotídicas de los cebadores específicos utilizados para la detección de las variantes <i>stx_{2b}</i> y <i>stx_{2d}</i> por PCR convencional | 53 |
| 10. Secuencia de oligonucleótidos específicos utilizados para la detección de los subtipos de <i>stx₁</i> por PCR convencional..... | 53 |
| 11. Secuencia de oligonucleótidos utilizados para detección del gen <i>eae-γ</i> | 54 |
| 12. Presentación clínica de los pacientes estudiados y aislamiento de STEC..... | 58 |
| 13. Frecuencia de serotipos hallados según diagnóstico..... | 61 |
| 14. Presencia de genes <i>stx₁</i> , <i>stx₂</i> , <i>eae</i> , <i>ehxA</i> , adhesinas putativas y toxinas distintas a Stx..... | 64 |
| 15. Genotipo <i>stx</i> de las cepas aisladas..... | 65 |
| 16. Perfiles genéticos identificados entre las cepas STEC O157..... | 66 |
| 17. Perfiles genéticos identificados entre las cepas STEC no-O157 | 66 |

Detección y caracterización de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga en niños atendidos en un Hospital Pediátrico de la ciudad de La Plata.

RESUMEN

Escherichia coli productor de toxina Shiga (STEC) es un patógeno transmitido por alimentos que puede causar un amplio espectro de enfermedades en el hombre, desde diarrea acuosa, diarrea sanguinolenta (DS) y síndrome urémico hemolítico (SUH). El propósito de este estudio fue determinar las características fenotípicas y genotípicas de cepas STEC aisladas de niños con DS y SUH atendidos en un Hospital Pediátrico de la ciudad de La Plata, y estudiar la relación clonal de los aislamientos O157:H7 por ERIC-PCR y electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) del ADN digerido con *Xba*I. Se analizaron 731 muestras de materia fecal de niños con diarrea sanguinolenta (DS) y 107 de niños con SUH. El porcentaje de positividad fue 4,9% y 39,2% en los pacientes con DS y SUH, respectivamente. Se aislaron 77 cepas STEC de 10 serotipos O:H distintos, y el 71,4% de ellos fue serotipo O157:H7. El 98,2% de los aislamientos O157:H7 fue biotipo C y sensibles a los antibióticos ensayados, y todas presentaban el fenotipo enterohemolítico. Todas las cepas O157:H7 portaban los genes *stx*₂, *eae*-γ1, *fliC*_{H7}, *ehxA*, *iha*, *efa*, *toxB*, *lpfA*1-3 y *lpfA*2-2. Entre ellas, el genotipo *stx* prevalente (76,4%) fue la combinación *stx*_{2a}/*stx*_{2c(vh-a)}. Entre las 22 cepas no-O157 aisladas, O145:NM fue el serotipo prevalente (54,5%) y el 90,9% fueron sensibles a los antibióticos ensayados. El 81,8% portaba el gen *ehxA* y el 81,8% eran *eae*-positivos. Los aislamientos *eae*-negativos pertenecieron a los serotipos O59:H19, O102:H6, O174:NM y O174:H21. Las cepas O59:H19 y O174:H21 fueron positivas para el gen *aggR*. La frecuencia de *iha*, *efa*1 y *toxB* fue del 81,8%, 77,2% y 72,7%, respectivamente. Las cepas O145:NM portaban las variantes *lpfA*1-5 y *lpfA*2-3. Entre las cepas no-O157/no-O145, *lpfA*2-1 fue la variante de *lpfA* más prevalente. No se aislaron cepas negativas para los genes *lpfA*1 y *lpfA*2 simultáneamente. Al estudiar la relación clonal de 51 cepas O157:H7, se establecieron 6 patrones ERIC-PCR (D=0,69). Entre las 51 cepas de STEC O157:H7 se identificaron por *Xba*I-PFGE un total de 42 patrones con al menos 88% de similitud, y se establecieron 6 *clusters* con perfiles idénticos (D=0,98). Se pudo establecer un vínculo epidemiológico entre los aislamientos pertenecientes al *cluster* #1, pero no fue posible establecer la fuente de contagio. Este estudio muestra que STEC de diferentes serotipos y genotipos circulan en la ciudad de La Plata y alrededores. A pesar de la diversidad genética observada entre los aislamientos O157:H7, algunos fueron indistinguibles por las técnicas de subtipificación utilizadas.

INTRODUCCIÓN

1. Enfermedad Diarreica Aguda

Las enfermedades diarreicas agudas continúan siendo uno de los problemas de salud pública más serios en los países en vías de desarrollo, con altas tasas de morbilidad y mortalidad, siendo la segunda causa de mortalidad en menores de 5 años.

La diarrea es un síndrome clínico de comienzo brusco y duración limitada, que en forma secundaria a una alteración en el transporte y absorción de electrolitos y agua, se caracteriza por el incremento en el número de evacuaciones al día y alteración en la consistencia de las heces, acompañado de otros síntomas como vómitos, náuseas, dolor abdominal o fiebre.

En nuestro país, la Sociedad Argentina de Pediatría (SAP) define la diarrea aguda como: “aumento de la frecuencia, fluidez y/o volumen de las deposiciones, con pérdida variable de agua y electrolitos y cuya duración es menor de 14 días”, mientras que la Organización Mundial de la Salud (OMS) define a la diarrea aguda en menores de 2 años como la deposición, tres o más veces al día (o con una frecuencia mayor que la normal para la persona) de heces sueltas o líquidas. La deposición frecuente de heces firmes (de consistencia sólida) no es diarrea, ni tampoco la deposición de heces de consistencia suelta y “pastosa” por bebés amamantados.

Según sus características clínicas, la diarrea puede clasificarse como:

- Diarrea aguda: Corresponde al cuadro clínico de diarrea usual, generalmente auto limitada, con pocos días de evolución, sin presencia de sangre visible y moco.
- Disentería/ Diarrea con sangre: En estos cuadros, la diarrea es sanguinolenta y puede incluir la presencia de moco. Puede tratarse de una diarrea invasora de origen bacteriano o amebiano, aunque las bacterias son las responsables más frecuentes de este cuadro.
- Diarrea persistente: La diarrea se inicia en forma aguda y se prolonga más de 14 días. Alrededor del 10% de los casos de diarrea aguda se vuelven persistentes. Esta condición deteriora el estado nutricional y está asociada con mayor mortalidad que la diarrea aguda. Una diarrea tiene mayor riesgo de prolongarse cuando los niños son menores de 6 meses, desnutridos o son alimentados

con fórmula o leche fluida. Entre el 35 al 50% de las muertes por diarrea son debidas a diarrea persistente.

Las enfermedades diarreicas son una causa principal de mortalidad y morbilidad en la niñez en el mundo. De acuerdo con datos de la OMS, se estima que en el año 2000 se produjeron cerca de 1.500 millones de episodios de diarrea aguda que causaron entre 1.4 y 2.5 millones de muertes en niños menores de 5 años (aproximadamente el 85% de las muertes ocurren en menores de un año).

En general, las enfermedades diarreicas son consecuencia de la exposición a alimentos o agua contaminados. En todo el mundo, 780 millones de personas carecen de acceso al agua potable, y 2.500 millones a sistemas de saneamiento apropiados. La diarrea causada por infecciones es frecuente en países en desarrollo, y los niños menores de tres años sufren, de promedio, tres episodios de diarrea al año. Cada episodio priva al niño de nutrientes necesarios para su crecimiento. En consecuencia, la diarrea es una importante causa de malnutrición, y los niños malnutridos son más propensos a enfermar por enfermedades diarreicas, afectando seriamente el desarrollo intelectual del niño.

Los agentes enteropatógenos responsables de las diarreas agudas son múltiples y pueden ser virus, bacterias y parásitos, siendo frecuente las asociaciones de dos o más agentes. Los virus (especialmente Rotavirus) causan del 70 al 80 % de las diarreas infecciosas. Las bacterias ocasionan entre el 10 y 20 % de los casos. Entre los agentes bacterianos se puede señalar a *Campylobacter* spp., *Shigella* spp., *Salmonella* no Typhi, *Vibrio cholerae*, *Yersinia* spp., *Clostridium difficile* y *Escherichia coli* diarreigénicos, entre otros.

1.1. *Escherichia coli*

El género *Escherichia* fue nombrado en honor al pediatra alemán Theodor von Escherich quien describió por primera vez la especie tipo del género, *Escherichia coli*, en 1885. Este bacilo gram negativo, es la bacteria anaerobia facultativa más abundante de la flora normal del tracto gastrointestinal y comprende cerca del 1% de la flora fecal total de los humanos y de la mayoría de los animales de sangre caliente. *Escherichia coli* es miembro de la familia *Enterobacteriaceae* y aunque la mayoría de los aislamientos no son patógenas, algunas de ellos pueden causar enfermedad tanto en el hombre como en animales.

Los aislamientos se pueden diferenciar serológicamente determinando los antígenos O (porción polisacárida del lipopolisacárido somático o LPS) y H (proteínas flagelares) (Nataro y Kaper, 1998). También puede ser determinado el serotipo utilizando métodos moleculares como la reacción de la polimerasa en cadena (PCR) de los genes involucrados en la biogénesis del antígeno O (ej: genes *wzx* y *wzy*) y del antígeno H (*fliC*). La designación NM o H⁻, indica la ausencia del antígeno H. Los antígenos O definen un serogrupo y una combinación específica de antígenos O y H definen el serotipo de un aislamiento. Actualmente se reconocen 174 antígenos O (numerados del O1 al O181, excepto O31, O47, O67, O72, O93, O94 y O122) y 56 antígenos H, sin embargo sólo un pequeño subgrupo de combinaciones O:H son asociadas con enfermedad (DebRoy y col., 2011; Bettelheim, 2014).

1.2. *Escherichia coli* patógenos para el hombre

Escherichia coli se comporta habitualmente como una bacteria comensal no patógena, pero debido a la gran plasticidad de su genoma ciertas cepas pueden adquirir factores de virulencia como consecuencia de la transmisión horizontal de genes a través de plásmidos, transposones, bacteriófagos y/o islas de patogenicidad y son capaces de producir enfermedades como infecciones urinarias, septicemia, meningitis e infecciones gastrointestinales. Los grupos patógenos o patotipos asociados a enfermedad diarreica en el hombre (DEC, por sus siglas en inglés, *diarrheagenic E. coli*) se clasifican según manifestaciones clínicas, características epidemiológicas y presencia de diferentes determinantes de patogenicidad en: *E. coli* enteropatógeno (EPEC), *E. coli* enterotoxigénico (ETEC), *E. coli* productor de toxina Shiga (STEC), *E. coli* enteroinvasivo (EIEC), *E. coli* enteroagregativo (EAEC) y *E. coli* de adherencia difusa (DAEC) (Nataro y Kaper, 1998; Bettelheim, 2007; Croxen y col., 2013). En el intestino humano, ETEC, EPEC y EAEC colonizan el intestino delgado, mientras que EIEC y STEC colonizan el intestino grueso.

1.3. *Escherichia coli* productor de toxina Shiga

En 1977, Konowalchuk y col., informaron 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 que generaba un efecto citotóxico sobre células cultivadas de riñón de mono verde africano (células Vero), a la que denominaron Verotoxina. Pocos años después, se demostró que estas toxinas producían

efecto citotóxico en células HeLa, el cual podía ser neutralizado por antisuero anti-toxina Shiga de *Shigella dysenteriae* tipo 1 (O'Brien y col., 1982), por lo cual se las llamo “*Shiga-like toxin*”.

En 1983, Riley y col., estudiando un brote de colitis hemorrágica (CH) ocurrido en Michigan y Oregon, asociado al consumo de hamburguesas insuficientemente cocidas, identificaron por primera vez el serotipo O157:H7 como patógeno humano. Ese mismo año, Johnson y col., demostraron que *E. coli* O157:H7 aislado de pacientes con CH producía la citotoxina que dañaba las células Vero, y Karmali y col., describieron la asociación entre casos esporádicos de síndrome urémico hemolítico (SUH) y *E. coli* productor de Vero toxina, hecho que representó un avance importantísimo en el conocimiento del agente causal y permitió diferenciar al SUH de otras microangiopatías trombóticas.

Originalmente se designó STEC al grupo de cepas de *E. coli* productoras de toxina Shiga. Posteriormente se designó como *E. coli* enterohemorrágico (EHEC) a un subgrupo de cepas STEC que se caracterizaban por compartir caracteres clínicos, patogénicos y epidemiológicos con la cepa prototipo O157:H7. Su nombre se debe a la capacidad que tienen estas cepas de producir CH y SUH en el hombre (Nataro y Kaper, 1998).

Las cepas STEC pertenecen a un amplio rango de serotipos, y se han descrito más de 1000 serotipos distintos aislados de animales y humanos (Bettelheim y col., 2014). *Escherichia coli* O157:H7 es el serotipo más comúnmente aislado en Europa y América y el prototipo de más de 470 serotipos que han sido aislados de humanos enfermos, que difieren en su virulencia, incidencia y severidad de las infecciones que producen (WHO, 1999; Blanco y col., 2004; Gould y col., 2013). Dentro de los serogrupos no-O157 que producen enfermedad en el humano se destacan O26, O45, O103, O111, O121 y O145 (Johnson y col., 2006). La explicación de porqué sólo un número restringido de serotipos está asociado a SUH no ha sido totalmente aclarada, pero la presencia de determinadas islas de patogenicidad en los serotipos asociados a brotes y SUH aumentaría la probabilidad de provocar enfermedad (Karmali y col., 2003; Wickham y col., 2006; Coombes y col., 2008). Por lo tanto, el serotipado no es suficiente para la identificación de un organismo como una EHEC; también deben estar presentes factores de virulencia característicos de dichos microorganismos. Las cepas de *E. coli* O157:H7 son relativamente homogéneas, y casi todos estos organismos llevan factores de virulencia asociados a CH y SUH. STEC serotipo O157:NM está estrechamente relacionada a O157:H7, pero posee una combinación distintiva de rasgos fenotípicos y de virulencia. Los miembros de otros serotipos pueden ser más heterogéneos y llevar diferentes grupos de factores de virulencia.

En el año 2003, a fin de esclarecer las diferencias en la virulencia de las cepas STEC, Karmali y col., propusieron una clasificación de los serotipos STEC en cinco seropatotipos (Tabla 1). La misma se basa en la incidencia y severidad de los distintos serotipos en enfermedad en el hombre y su asociación con la ocurrencia de brotes. Brevemente, el seropatotipo A comprende los serotipos O157:H7 y O157:NM, los cuales se asocian con brotes y SUH; seropatotipo B incluye los serotipos asociados con SUH y brotes, pero menos frecuentemente que el seropatotipo A; el seropatotipo C incluye aislamientos asociados a casos esporádicos de SUH pero no epidémicos; el seropatotipo D incluye aislamientos raramente encontrados en humanos y asociados con enfermedades menos severas (diarrea y CH), pero no están asociados a brotes ni SUH; el seropatotipo E incluye múltiples serotipos de STEC que nunca fueron encontrados en humanos.

Tabla 1. Clasificación de serotipos de STEC en seropatotipos.

| Seropatotipo | Incidencia relativa | Frecuencia en la ocurrencia de brotes | Asociación con enfermedad severa ^(a) | Serotipos |
|--------------|---------------------|---------------------------------------|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| A | Alta | Común | Si | O157:H7, O157:NM |
| B | Moderada | No común | Si | O26:H11, O103:H2, O111:NM, O121:H19, O145:NM. ^(b) |
| C | Baja | Rara | Si | O5:NM, O8:H19, O91:H21, O104:H21, O113:H21, O121:NM, O165:H25, O174:H28 |
| D | Baja | Rara | No | Múltiples |
| E | Nula en humanos | No aplicable | No aplicable | Múltiples |

(a): Síndrome urémico hemolítico (SUH) o colitis hemorrágica (CH)

(b): En EE.UU este grupo se ha extendido e incluye además O26:NM; O45:H2 y NM; O103:H11, H25 y NM; O111:H8 y O121:H7 (Bosilevac and Koohmaraie, 2011).

El esquema de categorización de STEC de Karmali fue revisado recientemente por un panel de expertos de la *European Food Safety Authority* (EFSA, 2013), y los mismos observaron que el esquema de Karmali estaba focalizado en aquellos serotipos clasificados como de “alto riesgo”, pero falla en reconocer la potencialidad de provocar enfermedad en humanos de otros serotipos (EFSA, 2013). El panel concluyó que a pesar de que “no hay un único marcador o combinación de marcadores que

definan un STEC patógeno”, la presencia de los genes *stx*₂ (codificante para la toxina Shiga 2) y *eae* (producción de intimina), o la combinación de *aaiC* (proteína secretada por EAEC) y *aggR* (regulador transcripcional codificado en un plásmido) se asociaron con un mayor riesgo de enfermedad más severa que otras combinaciones de genes de virulencia. Sin embargo, otras combinaciones de genes de virulencia y/o serotipos pueden estar asociados con enfermedad severa en humanos, incluido SUH. Basándose en estos resultados, el panel de expertos propuso un nuevo enfoque para la categorización de STEC (Tabla 2).

Tabla 2. Propuesta molecular para la categorización de STEC (EFSA, 2013)

| Grupo | Genes ^(a) | Serogrupo | Riesgo potencial | |
|-------|-------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|------------------|-------------|
| | | | Diarrea | CH/SUH |
| I | <i>eae</i> -positivo o (<i>aaiC</i> y <i>aggR</i>)-positivos | O157, O26, O103, O145, O111, O104 | alto | alto |
| II | <i>eae</i> -positivo o (<i>aaiC</i> y <i>aggR</i>)-positivos | cualquier otro | alto | desconocido |
| III | <i>eae</i> -negativo o (<i>aaiC</i> y <i>aggR</i>)-negativos | cualquier otro | desconocido | desconocido |

(a): Adicionales a la presencia de *stx*

1.4. Reservorios de STEC

Las infecciones por STEC son zoonóticas y STEC forman parte de la microbiota intestinal normal de un amplio grupo de animales. En la Argentina, como en el resto del mundo, los rumiantes, en especial el ganado bovino (tanto el ganado de carne como el ganado lechero), son el reservorio natural y más importante de *E. coli* O157:H7 y otros STEC (Sanz y col., 1998; Padola y col., 2004; Mercado y col., 2004). La colonización es transitoria o intermitente, de menos de 2 meses de duración (algunos animales pueden tener eliminación prolongada de hasta 12 meses), y los animales que dejaron de excretar pueden ser recolonizados. La portación fecal es más frecuente en el ganado joven (2 a 24 meses), y un mismo animal puede portar más de un serotipo de STEC.

Estudios realizados en Argentina han determinaron que la prevalencia de STEC en bovinos de pastoreo y en matadero fue del 32,8% y en bovinos de *feedlot* del 62,7% (Sanz y col., 1998; Padola y col., 2004). Estos resultados no difieren sustancialmente con los observados en otros países con

menor tasa de SUH. Estudiando bovinos de *feedlot*, se aisló *E. coli* O157 en el 6,8% de los animales muestreados en forma seriada (cada 2 semanas durante 6 meses) y en el 0,17% de los muestreados por única vez, confirmado la liberación intermitente de STEC al ambiente, lo que favorecería la transmisión entre animales, posibilitando la reinfección de los mismos (Padola y col., 2004).

Los terneros son portadores de los serotipos STEC no-O157 de mayor virulencia para el hombre y los serotipos de STEC aislados de terneros y bovinos adultos comparten los perfiles de virulencia de *E. coli* aislados de hamburguesas y carne molida (Parma y col., 2000). Una pequeña proporción del ganado bovino en un rodeo puede ser responsable de la liberación de más del 95% de los organismos. Estos animales, denominados súper-propagadores, están colonizados y pueden permanecer infectados durante más tiempo que otros bovinos (Chase-Topping y col., 2008).

En contraste con lo que ocurre en el humano, los bovinos infectados con STEC O157:H7 y no-O157 se mantienen tolerantes a la enfermedad, por lo cual la mayoría de los serotipos de STEC implicados en enfermedad en humanos no causan enfermedad en bovinos, excepto *E. coli* O157:H7 que puede causar ileocolitis fatal en terneros recién nacidos. Mientras los humanos expresan Gb3 en su endotelio vascular, que promueve mucho de la patofisiología asociada con las toxinas Shiga, el ganado casi no tiene expresión vascular de Gb3. Aunque este receptor ha sido detectado en el riñón y cerebro del ganado, la toxina Shiga no es capaz de unirse al endotelio vascular del tracto gastrointestinal (Pruimboom-Brees y col., 2000), y por lo tanto no puede ser endocitada y transportada a otros órganos e inducir el daño vascular. En contraste con los humanos, donde las STEC colonizan el colon, en el ganado colonizan la unión recto-anal (RAJ, del inglés *recto-anal junction*), la cual es impermeable a los efectos de la toxina Shiga.

Además del ganado vacuno, cerdos, ovejas y las cabras pueden comportarse como reservorios de STEC. Aves, perros y gatos son reservorios de menor importancia (Ferens y col., 2011).

1.5. Fuentes y vías de transmisión de STEC

Los STEC se transmiten al hombre a través de los alimentos y el agua contaminados con las heces de animales portadores o por medio del contacto directo con estos animales o con su medio ambiente a través de la vía fecal-oral (Armstrong y col., 1996; Rivas y col., 2008; Chinen y col., 2009) (Figura 1).

Debido a que posee una dosis infectante pequeña (unos 100 microorganismos), también es probable la transmisión por personas sintomáticas infectadas o portadores a través de la misma vía, en especial

durante un brote. La mayoría de las personas elimina STEC O157:H7 durante aproximadamente 7 a 9 días. Una minoría puede eliminarlo durante 3 semanas o más (incluso meses) después de la aparición de los síntomas y los niños pequeños suelen eliminar este microorganismo durante más tiempo que los adultos (Miliwebsky y col., 2007).

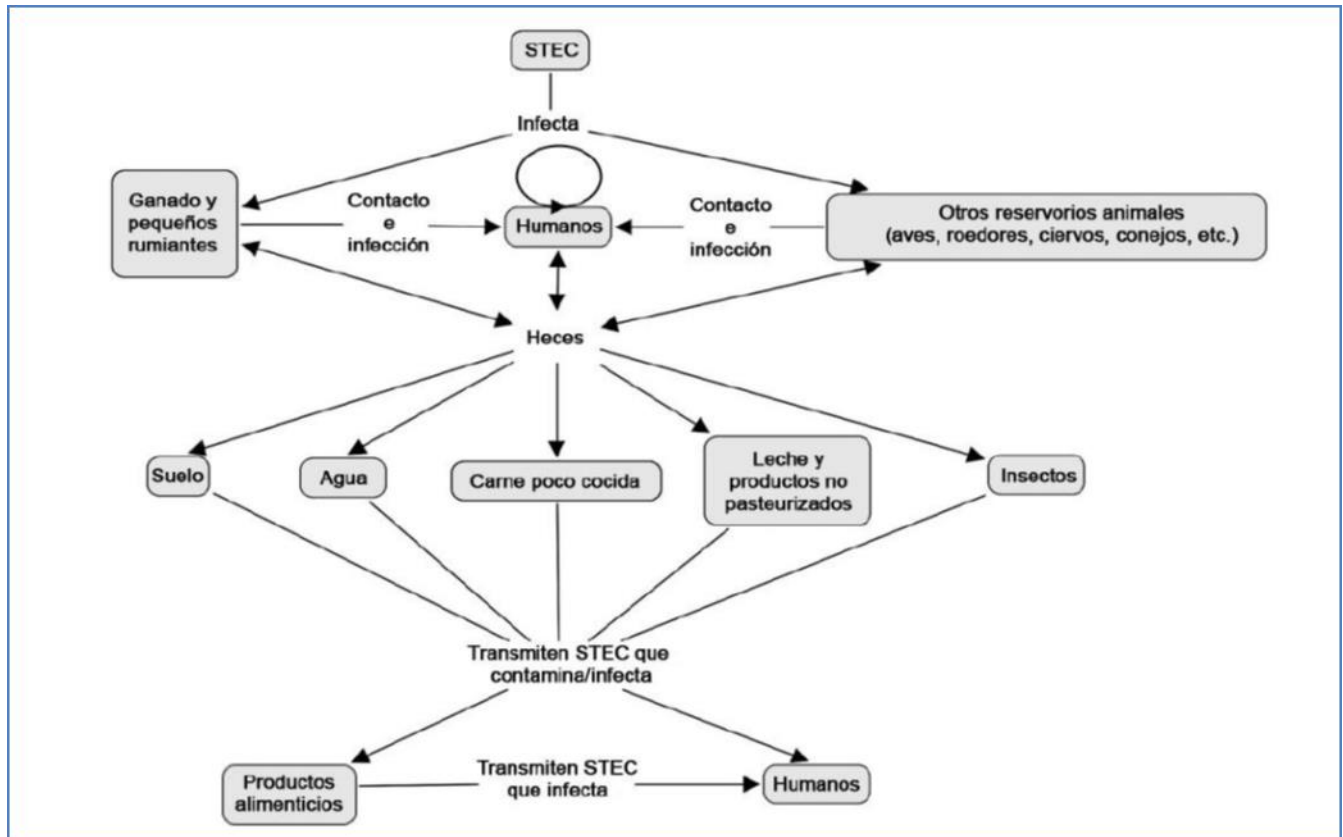


Figura 1. El diagrama muestra las relaciones entre los factores probados y postulados involucrados en la transmisión de STEC (Adaptado de García y col., 2010).

Los brotes de STEC O157:H7 de origen alimentario, generalmente, son causados por la ingesta de productos de origen animal mal cocidos o no pasteurizados. Las fuentes de infección que se han encontrado con mayor frecuencia asociadas a SUH en nuestro país son: alimentos con carne picada insuficientemente cocidos, productos lácteos no pasteurizados, vegetales crudos (alfalfa, lechuga, brotes de soja, espinaca y rábano), sidra de manzana, salame y morcilla (Chinen y col., 2009).

El agua de riego contaminada con heces es una fuente importante de STEC O157:H7 en los vegetales. Este organismo se puede adherir a las plantas y sobrevive en la superficie de una variedad de frutas, vegetales y hierbas culinarias frescas. De acuerdo con las condiciones ambientales, pequeñas cantidades de bacterias que permanecen en los vegetales lavados pueden multiplicarse de manera

significativa durante varios días. STEC O157:H7 puede internalizarse en los tejidos de algunas plantas, como la lechuga, donde es posible que resista al lavado. Las moscas de la fruta pueden transmitir este organismo a las plantas, donde se pueden multiplicar en los tejidos dañados. Además, puede permanecer viable por largos periodos en muchos productos alimenticios: puede sobrevivir al menos 9 meses en carne molida almacenada a -20°C, y puede permanecer infecciosa de semanas a meses en salchichas y queso Cheddar a temperaturas de refrigeración (García y col., 2010).

Un estudio publicado por Snedeker y col. (2009), analizando 90 brotes debidos a *E. coli* O157 (confirmados microbiológicamente) ocurridos en Inglaterra, Irlanda, Dinamarca, Noruega, Finlandia, Canadá, EE.UU. y Japón ocurridos entre 1982 y 2006, mostro que la fuente de transmisión de STEC fue 42,2% por alimentos, 12,2% productos lácteos, 7,8% por contacto con animales, 6.7% por agua y en el 28,9% de los casos no se identificó la fuente. En 2005, Rangel y col, analizando 350 brotes debidos a *E. coli* O157:H7 reportados al CDC entre 1982 y 2002, determinaron que la fuente de transmisión fue 52% por alimentos, 14% persona-persona, 9% por agua contaminada, 3% por contacto animal y 21% desconocido.

Otras conductas asociadas a infección incluyen: asistencia a natatorios insuficientemente clorados, bañarse en ríos o pozos de agua usados por el ganado para beber, visita a granjas, zoológicos, acampar en áreas usadas anteriormente para pastura de ganado, asistencia a jardines maternas donde acuden niños con diarrea (Rivas y col., 2008). El tiempo de supervivencia de STEC O157:H7 varía de 1 a 7 meses en el suelo, más de 2 meses en fuentes de agua dulce (especialmente a temperaturas frías) y al menos 2 semanas en agua de mar (Avery y col., 2008).

E. coli se puede destruir con numerosos desinfectantes, tales como hipoclorito de sodio al 1%, etanol al 70% y otros desinfectantes. Para asegurar la eliminación de STEC de los alimentos, el tratamiento térmico es el método recomendado. La temperatura de pasteurización de la leche (72°C, durante 16,2 seg.) es un método efectivo para eliminar 10⁴ células de *E. coli* O157:H7 por mililitro. En los alimentos cárnicos, la oficina de regulación y control de alimentos de EE.UU. (FDA, por sus siglas en inglés *Food and Drug Administration*) recomendó una temperatura interna de 68,3°C para la cocción de las hamburguesas (Griffin y col., 1994).

1.6. Presentación clínica de las infecciones por STEC

La infección por STEC O157:H7 puede causar un amplio espectro de manifestaciones clínicas en los seres humanos. Desde una diarrea acuosa no sanguinolenta o sanguinolenta, hasta una colitis hemorrágica (CH), con el SUH como complicación habitual en niños (ver más adelante).

El intervalo de tiempo transcurrido entre la ingestión del vehículo contaminado con STEC O157:H7 y el comienzo de la diarrea, suele oscilar entre 2 y 12 días, y se ha establecido un periodo medio de incubación de 3 a 4 días. Algunos casos se resuelven sin tratamiento en aproximadamente una semana, pero la presentación clínica más común en los niños es la evolución a CH, caracterizada por un cuadro grave de dolor abdominal, náuseas, vómitos y diarrea acuosa que cursa generalmente sin fiebre (en el 30% de los casos se produce fiebre de bajo grado). Luego de 1 a 3 días la diarrea suele tornarse sanguinolenta y suele ser lo que impulsa la consulta médica. La mayoría de los casos de CH son auto-limitantes y se resuelven espontáneamente en 5 a 7 días. La colitis grave puede provocar necrosis intestinal, perforación o el desarrollo de estenosis en el colon.

Los principales rasgos clínicos que pueden distinguir las infecciones producidas por STEC O157:H7 de las causadas por otros patógenos entéricos como *Shigella* spp., *Campylobacter* spp., o *Salmonella* spp., son ausencia de fiebre en la etapa aguda, recuento leucocitario superior a $1.10^9/l$ y flaccidez abdominal a la palpación. Ninguno de estos rasgos es específico de forma aislada, pero considerados en su conjunto son altamente significativos e indicativos de una infección por STEC O157:H7 (Slutsker y col., 1997; 1998).

Pese a expuesto, se han descrito infecciones producidas por *E. coli* O157:H7 totalmente asintomáticas, tanto en individuos escogidos al azar (Stephan y col., 1999) como en individuos relacionado con un caso esporádico de infección (Blanco y col., 2004) o con un determinado brote (Sakuma y col., 2006).

Las manifestaciones clínicas de las infecciones por STEC no-O157, pueden ir desde la diarrea acuosa no sanguinolenta hasta la CH, el SUH e incluso la muerte en un número considerable de casos (Johnson y col., 2006). Comparado con STEC O157:H7, se observa una mayor variabilidad en la sintomatología, aspecto que se ha relacionado con la alta heterogeneidad genética en este grupo de patógenos (Johnson y col., 2006). Un estudio realizado en Canadá (Pai y col., 1988) estudiando prospectivamente 5415 casos esporádicos de diarrea reveló diferencias significativas entre las infecciones provocadas por STEC O157 y no-O157. Aquellos pacientes infectados por STEC no-O157

tenían un cuadro diarreico más prolongado (duración media 9,1 vs 5,7 días; $P < 0,001$) y menos frecuencia de diarrea sanguinolenta (42% vs 97%; $P < 0,001$). En contraste, la tasa de dolor abdominal, vómitos y fiebre $>38^{\circ}\text{C}$, no mostraron diferencias significativas.

Aproximadamente entre 5 y el 15% de los pacientes con CH progresan al desarrollo del SUH (Mead y col., 1998; Tarr y col., 2005; Manning y col., 2008). Entre los factores predictivos de evolución a SUH se incluyen: la edad (menos de 5 años), leucocitosis, tratamiento con agentes reductores de la motilidad intestinal en la etapa de la diarrea o anti diarreicos, el uso de antimicrobianos, diarrea mucosanguinolenta en el período prodrómico, período prodrómico corto y el genotipo de la cepa infectante (Ostroff y col., 1989).

Estudiando diversos brotes debidos a STEC O157:H7, se ha observado que la severidad de la enfermedad, las tasas de evolución a SUH y la frecuencia de hospitalización varía en un amplio rango. Por ejemplo, un brote ocurrido en Japón en 1996, tuvo baja tasa de hospitalización (3-5%) y bajo porcentaje de SUH (0-3%), en cambio el brote relacionado al consumo de espinacas ocurrido en EE.UU. en 2006, tuvo alta tasa de hospitalización (51%) y alta tasa de SUH (15%) (Manning y col., 2008). Estas diferencias podrían deberse a las características genéticas de las bacterias involucradas, que daría lugar a diferencias en la virulencia de las mismas. Para probar esta hipótesis, Manning y col. (2008), evaluaron en una colección de 519 STEC O157 la presencia de 96 polimorfismos de nucleótido único (SNP, por sus siglas en inglés), ubicados en 83 genes. En análisis filogenético de estos SNPs, permitió agrupar los perfiles en 39 genotipos, los cuales fueron separados en 9 clados distintos. Ellos encontraron que más del 75% de las cepas estudiadas pertenecían a los clados 2, 3, 7 y 8. El análisis epidemiológico reveló una asociación significativa entre la infección con cepas del clado 8 y el desarrollo de SUH (siete veces más probable de desarrollar SUH que las cepas de los otros clados combinados). Las cepas del clado 8 frecuentemente poseían el genotipo *stx_{2a}/stx_{2c}*, eran aisladas de pacientes jóvenes (0-18 años) y las tasas de hospitalización eran mayores en comparación con los otros clados. Estas cepas, consideradas hipervirulentas, son responsables de una enfermedad más severa y de progresión rápida, que dificultaría el diagnóstico durante la fase de diarrea, detectándose el agente etiológico recién una vez establecido el SUH. Además de los EE.UU., las cepas STEC del clado 8 fueron descritas en Noruega (Haugum y col., 2011), Suecia (Eriksson y col., 2010), Japón (Yokoyama y col., 2011), Australia (Mellor y col., 2012) y Argentina (Pianciola y col., 2014).

1.6.1. Síndrome urémico hemolítico

El concepto de síndrome urémico hemolítico (SUH) describe un grupo heterogéneo de enfermedades caracterizadas por anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia y fallo renal agudo. El SUH fue descrito por primera vez por el médico Suizo Gasser (1955), y en Argentina los primeros casos fueron estudiados en la década de 1960 por el grupo del médico pediatra Carlos Gianantonio, quienes presentan 58 casos de SUH recopilados durante el período 1957 a 1963 en el Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez de Buenos Aires y propusieron la diálisis peritoneal como tratamiento para el período agudo, lo que redujo la mortalidad en este periodo del 50% al 5% (Gianantonio y col., 1964).

Este síndrome es más frecuente en niños, ancianos y personas inmunodeprimidas. Como todo síndrome, obedece a varias causas: infecciosas (secundario a infecciones por STEC, *Shigella dysenteriae* tipo I, *Streptococcus pneumoniae* productor de neuraminidasa, *Salmonella* Typhi, *Campylobacter fetus/jejuni*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Bacterioides* spp., virus Portillo, virus Cocksackie, virus Epstein Barr, rotavirus, VIH, etc.), asociado con drogas (anticonceptivos orales, mitomicina, ciclosporina A), durante el embarazo, postrasplante de médula y riñón, asociado con glomerulopatías y procesos malignos, desordenes autoinmunes, tumores malignos e idiopática (Neill, 1994).

En la actualidad, la principal etiología del SUH es la secundaria a una infección gastrointestinal por cepas de STEC (más del 90% de los casos mundiales). Este tipo de SUH, precedido por diarrea y de características endemo-epidémicas, es llamado en la bibliografía internacional forma clásica o SUH D+, aunque sería más correcto diferenciar aquellos cuadros de SUH con evidencias de infección por STEC o sin ella, ya que existen cuadros D- con Stx en deposiciones (Tarr y col., 2005). Esta forma de presentación tiene menor riesgo de secuelas que la forma no clásica o SUH D-.

El SUH post diarreico o D+ afecta fundamentalmente a niños de entre 6 meses y 5 años de edad, generalmente eutróficos, de clase media, con buenas condiciones sanitarias y ambientales, aunque también puede observarse en adolescentes y adultos (Paton y col., 1998). Se caracteriza por la presencia de anemia hemolítica, trombocitopenia e insuficiencia renal aguda (IRA) con microangiopatía de selectiva localización renal, pudiendo afectar también otros parénquimas como el aparato digestivo, el sistema nervioso y menos frecuentemente el corazón, el páncreas y el hígado (Andreoli y col., 2002), por lo que se la considera una enfermedad con compromiso multisistémico.

Luego de la etapa aguda del SUH, el 95% de los pacientes se recupera sin secuelas aparentes. Pero, durante la evolución al largo plazo, solo el 62% se recupera completamente, el 18% recupera la función renal normal presentando proteinuria y/o hipertensión arterial (HTA), el 16% desarrolla insuficiencia renal crónica con proteinuria y/o HTA y aproximadamente el 4% desarrolla insuficiencia renal crónica terminal, los cuales suelen requerir trasplante renal (Mead y col., 1998; Tarr y col., 2005; Spizzirri y col., 1997).

Otras secuelas que pueden observarse son diabetes mellitus y desórdenes neurológicos (Spizzirri y col., 1997).

La forma de SUH que generalmente se observa en adultos, especialmente ancianos, en ocasiones se denomina púrpura trombocitopénica trombótica (PTT). En la PTT, habitualmente se produce menor daño renal que en los niños, pero son más comunes los signos neurológicos que incluyen convulsiones, deterioro del sistema nervioso central y accidente cerebro vascular. La mortalidad de la PTT llega al 50% de los pacientes afectados.

1.6.2. Epidemiología del SUH y situación en Argentina.

El SUH es una enfermedad ampliamente distribuida en el mundo y frecuentemente se lo describe como una enfermedad epidémica con baja incidencia en países industrializados, como EE.UU., Canadá, Sudáfrica, Holanda, Gran Bretaña, Francia, Alemania, Bélgica y Japón (1-3 casos/100.000 <5 años) (Griffin y col., 1991). En Australia y Nueva Zelanda, la incidencia anual es aproximadamente de 1,0 a 1,3 casos cada 100.000 niños menores de 5 años (Elliott y col., 2004). En América del Sur el problema se concentra principalmente Argentina, Chile y Uruguay, donde el SUH es endémico y epidémico. En Chile, en el área metropolitana, la incidencia es 3,2 casos cada 100.000 niños (Reyes y col., 2004), y en Argentina se registra una incidencia anual de SUH post-enterico de 12 -17 casos cada 100.000 niños menores de 5 años, siendo la más alta a nivel mundial. La razón de esta alta incidencia es desconocida, pero puede ser debido a la exposición excesiva a factores de riesgo conocidos, incluyendo el consumo de carne, jugar en aguas recreativas contaminadas y contacto con el reservorio (Bentancor y col., 2011). Por lo contrario, Brasil tiene baja incidencia de SUH y los casos de STEC O157: H7 son poco frecuentes (Iriño y col., 2002).

Los niños afectados son menores de 5 años, fundamentalmente entre 6 y 36 meses, de ambos sexos, generalmente eutróficos y de nivel socioeconómico cultural medio-alto (Griffin y col., 1991).

En Argentina, la vigilancia epidemiológica de las enfermedades asociadas a STEC se realiza mediante distintas estrategias: 1) Notificación de los casos clínicos de SUH al Sistema Nacional de Vigilancia de la Salud (SNVS-Módulo C2), de forma obligatoria, inmediata e individualizada (Resolución Ministerio de Salud N°346/00). El tipo de vigilancia adoptada es de carácter pasivo, esto significa que la recolección de los datos se origina desde los hospitales donde se internan los casos; 2) Vigilancia Centinela, a través de 25 unidades centinela de SUH ubicadas en 16 provincias. Cada Unidad Centinela está integrada por tres componentes: clínico, epidemiológico y de laboratorio; 3) Vigilancia basada en Laboratorio (SNVS-Módulo SIVILA) a través de la Red Nacional de Diarreas y Patógenos Bacterianos Transmitidos por Alimentos. Esta red está integrada por los Laboratorios de Referencia Nacional (LNR) que funcionan en el INEI “Carlos Malbrán” y 544 laboratorios de distintos niveles de complejidad diagnóstica; 4) Vigilancia Molecular de subtipos circulantes a través de PulseNet de América Latina y El Caribe.

Los registros oficiales en la Argentina muestran que el SUH es endémico, notificándose más de 300 casos nuevos por año (Casos totales/año: 464/2006, 522/2007, 543/2008, 487/2009, 351/2010, 450/2011, 407/2012, 319/2013), la incidencia anual estimada varió de 10 a 17 casos/100.000 niños menores de 5 años, y la letalidad del 1 al 5%. En el período 2010-2013 fueron notificados 1527 casos, de los cuales el 81% (1238) pertenecen al grupo de menores de 5 años, 13% (198) al grupo entre 5 a 9 años y el 6% restante fueron notificados en edades mayores o sin especificar. Entre los niños menores de 5 años, la tasa más alta se observa en los niños de 1 año. La enfermedad está distribuida en todo el país, pero la mayor cantidad de casos proviene de las jurisdicciones del centro del país (Buenos Aires, CABA, Córdoba Entre Ríos, Santa Fe) y las tasas más elevadas del sur, en especial Chubut, La Pampa y Santa Cruz (Antman y col., 2014).

La infección por STEC muestra una variación estacional, con aumento de casos en primavera y verano, época que coincide con el período de mayor portación de STEC en el ganado bovino, aunque se registran casos durante todo el año (Rivas y col., 2006 a).

En Argentina, esta entidad es la principal causa de IRA y de hipertensión arterial en lactantes y niños pequeños. Además, es la segunda causa de insuficiencia renal crónica y de trasplante renal en la Argentina (Grimoldi y col., 2008). *Escherichia coli* productor de toxina Shiga es el agente etiológico más comúnmente asociado al SUH en Argentina, y el serotipo más frecuente es O157:H7 (Rivas y col., 2006 a).

Shigella dysenteriae tipo 1, también asociada a casos de SUH en otros países, nunca fue aislada en casos de SUH en nuestro país (Rivas y col., 2011).

1.6.3. Uso de antimicrobianos y STEC. Tratamiento del SUH.

El uso de antibióticos en las infecciones por STEC es controversial. Estudios *in vitro* han demostrado que la exposición a concentraciones sub-inhedoras de fluorquinolonas, incluyendo ciprofloxacina, producen daño del ADN e inducción de una respuesta SOS, y simultáneamente se gatilla la producción del fago y la expresión del gen de la toxina Shiga tipo 2 (*stx*₂) (McGannon y col., 2010). Trimetoprima y furazolidona (pero no fosfomicina) también actúan aumentando la expresión de los genes codificantes de *stx*₂ a través de la inducción del ciclo lítico del fago en donde se encuentran codificadas, produciendo una gran liberación de toxinas y siendo un factor de riesgo de progresión a SUH (Kimmit y col., 2000). Cuando se realizaron los estudios *in vivo* utilizando un modelo animal, también se observó un aumento en la expresión y liberación de Stx cuando eran administrados ciprofloxacina o trimetoprima-sulfametoxazol pero no fosfomicina (Zhang y col., 2000). Además, el estudio prospectivo realizado por Wong y col. (2012), demostró que el uso de antibióticos durante una infección por *E. coli* O157:H7 aumenta la tasa de desarrollo de SUH y su uso debe ser evitado (Wong y col., 2012).

El uso de antidiarreicos, antiinflamatorios no esteroideos y otros agentes que inhiban la motilidad intestinal está contraindicado. Para aquellos casos en que el cuadro clínico es sugerente, se recomienda la hospitalización con medidas de aislamiento entérico y medición frecuente de los parámetros básicos como balance hídrico y diuresis (Tarr y col., 2005).

No existe, actualmente, un tratamiento específico para SUH (Tarr y col., 2005). El único tratamiento disponible es de sostén y no existen terapias específicas ni preventivas. Generalmente incluye el manejo del medio interno, el control de la hipertensión, el uso de diálisis (peritoneal o hemodiálisis) y transfusiones de sangre de acuerdo al estado de la función renal y al grado de anemia (Fernández-Brando y col., 2011).

1.7. Principales marcadores de virulencia de STEC

Se ha sugerido que los productos de varios genes plamídicos y cromosómicos juegan un rol en la virulencia de estos patógenos, entre los que se incluyen diversas toxinas, adhesinas, proteasas, sistemas de adquisición de hierro, LPS y flagelina, entre otros (Paton y col., 1998).

1.7.1. Toxinas Shiga

Las toxinas Shiga (Stx) son consideradas el principal factor de virulencia de STEC. Estas toxinas comparten las siguientes propiedades: una estructura conservada de subunidades A₁B₅, siendo la subunidad A (33 Kda) la parte biológicamente activa (actividad N-glicosidasa, que provoca inhibición de la síntesis proteica) y la subunidad pentamérica B (7,5 Kda cada monómero) responsable de la unión de la toxina al receptor celular específico llamado globotriaosilceramida (Gb3) presente en las células blanco eucariotas (Stx2e se une preferentemente a Gb4); estructura de operón (*stxA* inmediatamente upstream de *stxB* con una secuencia intergénica corta); propiedades biológicas que incluyen neurotoxicidad en ratones y citotoxicidad en líneas celulares como Vero y HeLa (Scheutz y col., 2012).

Basados en sus propiedades inmunológicas, la familia de toxinas Shiga ha sido clasificada en dos grupos o tipos principales: Stx1 y Stx2. La estructura primaria de Stx1 es casi idéntica a Stx de *Shigella dysenteriae* tipo 1 (Takao y col., 1998). En cambio, Stx2 comparte con Stx1 entre un 57% y 60% de homología en la secuencia aminoacídica de las subunidades A y B, respectivamente, aunque la actividad biológica de Stx2 es similar a Stx1 (Noda y col., 1987). Estas toxinas actúan inhibiendo la síntesis de proteínas, evitando la unión del aminoacil-RNA^t dependiente del factor 1 de elongación a la sub-unidad 60S del ribosoma. La familia Stx inactiva la sub-unidad 60S al hidrolizar un enlace N-glicosídico de un residuo de adenosina en el extremo 5' terminal en la sub-unidad 28S del ARNr (Paton y col., 2006).

Cada uno de estos grupos posee varios subtipos y estos un número creciente de variantes, que difieren en uno o más aminoácidos del prototipo (Scheutz y col., 2012). El grupo de Stx1 es bastante homogéneo, está compuesto por los subtipos Stx1a, que difiere en uno de los aminoácidos con la toxina Shiga de *Sh. dysenteriae*, Stx1c y Stx1d. En contraste, el grupo de las Stx2 es más heterogéneo y comprende a los subtipos Stx2a, Stx2b, Stx2c, Stx2d, Stx2e, Stx2f y Stx2g, que comparten entre 84-99% de homología. Los operones de Stx1 y Stx2 están localizados en bacteriófagos lamboides e

integrados dentro del cromosoma, excepto los genes de Stx2e, Stx2f y Stx de *S. dysenteriae* tipo 1, que están localizados en el cromosoma bacteriano, pero no en fagos. Estos fagos pueden revertir a un ciclo lítico en condiciones de *stress* bacteriano, como daño del ADN por agentes tales como la luz ultravioleta, mitomicina C o ciertos antibióticos como ciprofloxacina. Como resultado del proceso de inducción, aumenta la expresión de Stx1 y Stx2, las células bacterianas se lisan, liberan shigatoxinas y partículas de fagos que pueden infectar a otras bacterias (Neely y col., 1998; Muniesa y col., 2004). También, ha sido reportado la pérdida del fago portador de *stx* en aislamientos humanos de O26:H11/NM, O157:NM, O145:H28/NM y O103:H2/NM (Bielaszewska y col., 2007; Friedrich y col., 2007).

Las cepas STEC pueden portar una sola variante *stx*₁/*stx*₂ y/o una combinación de subtipos de *stx*₂ (ejemplo: *stx*_{2a} y *stx*_{2c}). Si bien los miembros de la familia Stx muestran similitud en su estructura y función, cada uno de los subtipos presenta grandes diferencias en su actividad biológica y asociación con enfermedades. Stx2 tiene una actividad citotóxica de 100 a 1000 veces superior a Stx1 frente a las células endoteliales renales y los humanos infectados con cepas productoras de Stx2 desarrollan SUH más frecuentemente que aquellos infectados con cepas productoras de Stx1 o Stx1 más Stx2 (Paton y col., 1998). Los subtipos Stx2a y Stx2c se encuentran frecuentemente asociadas a casos de CH y SUH, pero el riesgo de desarrollar SUH después la infección con STEC del genotipo *stx*_{2c} ha sido significativamente menor que después de la infección con STEC del genotipo *stx*_{2a} (Friedrich y col., 2002).

El subtipo de Stx2 llamado Stx2d_{activable} (es más citotóxica en presencia de elastasa que cliva dos aminoácidos de la región C-terminal del péptido A2 enzimáticamente activo de Stx2d) se encuentra entre las variantes más citotóxicas de Stx2, se ha asociado a CH y SUH y sólo se la ha encontrado en cepas de STEC LEE-negativas (Melton-Celsa y col., 1996; Bielaszewska y col., 2006; Galli y col., 2010 a). Otros subtipos de toxinas, como Stx2b (antes llamada Stx2-O118, asociada al ganado ovino), Stx2e (asociada a la enfermedad de edema de pulmón en cerdos) y Stx2f (aislada de heces de paloma) se asocian frecuentemente con diarrea no complicada o excretores asintomáticos (Piérard y col., 1997; Schmidt y col., 2000). El gen *stx*_{2g} se detectó en cepas de STEC de origen bovino serotipos O2:H25, O2:H45 y Ont:NM (Leung y col., 2003). Stx1c se ha encontrado fundamentalmente en STEC *eae*-negativa aisladas de ganado ovino y ha sido asociada a casos de diarrea leve en humanos (Brett y col., 2003) y Stx1d fue detectada en un aislamiento de *E. coli* Ont:H19 aislado de ganado bovino (Bürk y

col., 2003). Por lo tanto, la caracterización del genotipo *stx* posee un importante valor predictivo de evolución a SUH en un paciente infectado por STEC (Jelacic y col., 2003; Scheutz y col., 2012).

Además de STEC y *Sh. dysenteriae*, se han encontrado variantes de Stx en otros géneros bacterianos como *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Acinetobacter*, *Campylobacter* y *Hamiltonella* (Paton y col., 1998).

1.7.2. Otras toxinas (SubAB, CDT-V y EAST1)

Además de la presencia de Stx, otras toxinas, que pueden jugar un rol en la patogénesis de STEC, han sido reportadas. Estudiando una cepa de STEC O113:H21, responsable de un brote de SUH en Australia, fue detectada la presencia de una citotoxina adicional, la cual era letal para el ratón, provocando extenso daño en la microvasculatura renal, hepática y cerebral (Paton y col., 1999, 2004).

La nueva toxina pertenecía a la familia de citotoxinas AB₅ y se la denominó subtilasa (SubAB).

El operón de la toxina consiste en 2 genes co-transcriptos, designados *subA* y *subB*, localizados en el megaplásmido de virulencia pO113. La holotoxina es altamente tóxica para varios tipos celulares, incluyendo una actividad 10 a 100 mayor que las Stx sobre las células Vero. La unión de la subunidad B a glicanos presentes en la superficie celular provoca la internalización (dependiente de clatrina) y el tráfico intracelular por una vía retrograda (del Golgi al RE). La subunidad A es una proteasa semejante a la subtilasa de *Bacillus anthracis* y la citotoxicidad para las células eucarióticas es debido al clivaje de un sitio único presente en la proteína BiP. Esta proteína es una chaperona localizada en el RE, perteneciente a la familia Hsp70. Este clivaje gatilla una severa respuesta de *stress* del RE, que resulta por último en apoptosis de la célula. Su rol en enfermedades humanas resta ser establecido.

Otra citotoxina encontrada en algunas cepas STEC es la llamada CDT (del inglés, *cytolethal distending toxin*). Esta toxina fue detectada por primera vez en 1987 en una cepa de *E. coli* O128 aislada a partir de la muestra fecal de un niño de 2 años con gastroenteritis. En la actualidad, se considera que pertenece a una familia emergente de toxinas producida por diferentes patógenos: STEC, EPEC, *Shigella dysenteriae*, *Campylobacter* spp, *Salmonella* Typhi, entre otros (Guerra y col., 2011).

La proteína CDT está codificada por un *cluster* de tres genes adyacentes, solapados y conservados entre los diferentes grupos bacterianos: *cdt-A*, *cdt-B* y *cdt-C*. Éstos dan lugar a tres polipéptidos, que se unen y forman la holotoxina que es de tipo AB₂. Cdt-B constituye la subunidad catalítica, mientras que Cdt-A y Cdt-C forman un heterodímero encargado de la translocación de ésta en la célula huésped (Guerra y col., 2011).

La toxina CDT actúa induciendo la formación de células mononucleadas gigantes y bloqueando el ciclo celular en la transición G2-M, gatillando el arresto celular y generando un daño irreversible a las células epiteliales humanas. El proceso se inicia con la entrada de la toxina a la célula, endocitada vía partículas recubiertas de clatrina. Es transportada a través del aparato de Golgi y RE, y luego Cdt-B entra al núcleo actuando como ADNasa, provocando la ruptura del ADN de doble cadena. Como consecuencia, las células dejan de dividirse pero continúan aumentando en volumen, de manera que se produce la distensión celular (hasta 5 veces el tamaño original) y finalmente la muerte. A raíz de este fenómeno, Bielaszewska y col. (2004), sugirieron que esa toxina puede contribuir en la patogénesis mediada por STEC, en particular en los aislamientos *eae*-negativos. Hasta el momento se han descrito 5 variantes genéticas de la toxina en *E. coli*: *cdt-I*, *cdt-II*, *cdt-III*, *cdt-IV* y *cdt-V*. Las secuencias que codifican para Cdt-I, Cdt-II, Cdt-III y Cdt-IV se encontraron en EPEC, *E. coli* causantes de infecciones extra intestinales y *E. coli* patógenos para animales. La quinta variante, Cdt-V, fue descrito principalmente en STEC O157 fermentador del sorbitol y en aislamientos *eae*-negativos como O91:H21 y O113:H21 (Janka y col., 2003; Bielaszewska y col., 2004).

La enterotoxina termoestable característica de *E. coli* enteroagregativa (EAST1, del inglés *enteroaggregative E. coli heat-stable toxin 1*), es una toxina identificada por primera vez en una cepa EAEC aislada de un niño con diarrea (Savarino y col., 1991). El gen *astA*, que codifica su producción, se puede encontrar en forma cromosomal y/o plasmídica, en una o más copias. Además de encontrarse en algunas cepas de EAEC, se encontró en otros patotipos de *E. coli* diarregénicos, incluyendo STEC O157:H7, ETEC, DAEC y EPEC. También se aislaron cepas EAST1 positivas en humanos sanos, sin embargo se asocia comúnmente con el ganado porcino y bovino (Veilleux y Dubreuil, 2006).

1.7.3. Factores de adherencia intestinal

La adherencia al epitelio intestinal y la colonización del intestino es un componente esencial en el proceso de patogénesis. La capacidad de STEC de adherirse en forma específica y estrecha al enterocito del intestino grueso, permite a la bacteria secretar las toxinas eficientemente (Tarr y col., 2000).

1.7.3.1. Intimina y región LEE

La región llamada LEE (del inglés, *locus of enterocyte effacement*), es una isla de patogenicidad cromosómica descrita en cepas de STEC, EPEC y *Citrobacter rodentium*. Esta isla de 35,6 kb contiene 41 genes organizados en 5 operones policistrónicos denominados LEE1, LEE2, LEE3, LEE4 y LEE5 (Figura 2). La regulación de LEE es muy compleja e involucra genes localizados dentro de LEE como *ler*, *grlA* y *grlR* (Kaper y col., 2004; Castillo y col., 2005) y fuera del mismo, como H-NS (que actúa como represor) e IHF (que actúa como activador) (Spears y col., 2006). El *locus* LEE está involucrado en la íntima adhesión a las células epiteliales intestinales, la iniciación de señales de transducción en las células epiteliales y la formación de lesiones de adherencia y borrado del enterocito o lesión A/E (del inglés, *attaching and effacing*) caracterizado por la destrucción de las microvellosidades, con la formación de pedestales ricos en actina y otros elementos de citoesqueleto en la región apical del enterocito que modifican su morfología normal y su función (Elliott y col., 2000).

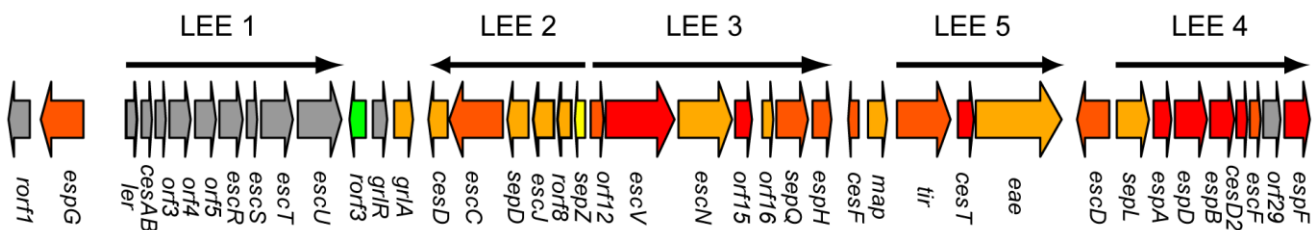


Figura 2. Organización de la isla de patogenicidad LEE.

Los operones LEE1, LEE2 y LEE3 codifican un sistema de secreción tipo III (SSTIII), empleado en el transporte de proteínas efectoras hacia la célula huésped. En el LEE4 se codifican los genes de las proteínas que se secretan a través del SSTIII, responsables de inducir eventos de transducción de señales en las células epiteliales intestinales, las cuales se conocen de forma colectiva con el nombre Esp (del inglés, *E. coli secreted proteins*). En el operón LEE5 se encuentran codificados el gen *eae* (del inglés, *enterohemorrhagic E. coli attaching and effacing*), que codifica una proteína de membrana externa denominada intimina, y su receptor translocado denominado Tir (del inglés, *translocated intimin receptor*) responsables de la unión íntima de la bacteria al enterocito (Louie y col., 1993) (Figura 2).

El aparato secretor consiste en una estructura molecular tipo aguja que comienza en el interior del citoplasma bacteriano, atraviesa las membranas interna y externa, y pasa a través de la membrana

celular del enterocito. Las proteínas secretadas son transferidas desde el citoplasma bacteriano hasta la célula hospedadora a través de esta estructura, incluida la proteína Tir, la cual una vez allí se inserta en la membrana plasmática exponiendo su dominio central que funciona como receptor de la intimina que se expresa en la superficie de la bacteria.

La comparación de la secuencia nucleotídica de LEE de STEC O157 y cepas de EPEC reveló diferencias en los genes que codifican la unión íntima de la bacteria al enterocito. Actualmente, se han descrito 17 variantes de intimina ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, $\xi R/\beta 2B$, $\delta/\kappa/\beta 2O$, $\gamma 1$, $\theta/\gamma 2$, $\epsilon 1$, $\nu R/\epsilon 2$, ζ , η , $\mu R/\tau 2$, λ , μB , νB y ξB) en función de la heterogeneidad de la parte C-terminal de la molécula. Algunos tipos de intimina, como la intimina $\alpha 1$ se ha asociado a EPEC (O127:H6 y O157:H45, por ejemplo), mientras que otras, como la intimina $\gamma 1$, se han encontrado en STEC (O157:H7 y O145:NM). Además, se ha postulado, que el tipo de intimina influye en el tropismo y patrón de colonización. El reemplazo de *eae*_{O157} por *eae* de una cepa EPEC, resulta en la colonización del intestino delgado por la cepa O157:H7 modificada (Tzipori y col., 1995; Fitzhenry y col., 2002). Por contraste, la cepa salvaje de O157:H7 coloniza el colon. Además de su unión a Tir, se ha demostrado que la intimina tiene afinidad por las proteínas eucariotas nucleolina (Frankel y col., 1996) y $\beta 1$ -integrina (Sinclair y col., 2002) y servirían como potenciales receptores durante la infección.

Por otro lado, el SSTIII también secreta muchas otras proteínas codificadas fuera de LEE llamadas Nle (del inglés, *non-LEE-encoded effectors*). Un ejemplo es la secreción de la proteína EspFu, que coopera con Tir en el reclutamiento de proteínas del huésped (como N-WASP e IRSp53) y en la inducción de la polimerización de actina. Esto resulta en la acumulación de actina por debajo del sitio de unión de STEC, formando una estructura tipo pedestal, que provoca la desorganización de las microvellosidades con producción de la lesión A/E (Weiss y col., 2009). La formación de la lesión A/E es esencial para la colonización de la mucosa intestinal por patógenos LEE-positivos. Mutaciones *knock out* en los genes *eae*, *tir*, *espA* y *espB* anulan la habilidad de los patógenos de causar la lesión A/E y afecta su capacidad de colonizar y causar enfermedad (Doughty y col., 2002). Sin embargo, la presencia de LEE no es esencial para la patogénesis, dado que cepas LEE-negativas como O91:H21, O104:H4 y O113:H21 son capaces de causar enfermedad severa, incluyendo SUH. Por lo tanto, otros factores de virulencia, incluyendo adhesinas codificadas fuera de LEE, estarían involucrados en la patogénesis.

1.7.3.2. Adhesinas codificadas fuera de la región LEE

Distintas proteínas han sido propuestas como nuevas adhesinas, incluyendo LPF1, LPF2, Iha, Efa1 (codificadas en islas de patogenicidad del cromosoma de *E. coli* EDL933), ToxB y Saa (codificadas en el megaplásmido de STEC) entre otras (Farfan y col., 2012).

a) Fimbria polar larga

La fimbria polar larga (LPF, del inglés *long polar fimbriae*) es una estructura que fue identificada por primera vez en *Salmonella entérica* serovar Typhimurium. Poseen un diámetro de 7-8 nm y una longitud de 2-10 µm, extendiéndose desde los polos de la bacteria. En *Salmonella* Typhimurium, LPF facilita la unión de la bacteria a la placa de Peyer murina (Baümler y col., 1996). Cuando se analizó la secuencia de ADN de cepas O157:H7, se encontraron 2 *loci* que contenían genes relacionados al operón *lpf* de *Salmonella* Typhimurium. El primer *locus*, denominado *lpf1*, está localizado en una isla de patogenicidad específica de O157 denominada OI-141. Este operón contiene 6 genes (*lpfABCC'DE*) similares en secuencia y orden a los genes de *Salmonella* (Torres y col., 2002) y se ha demostrado que la mutagénesis en cepas STEC O157:H7 de la principal sub-unidad fimbrial (codificada por el gen *lpfA1*), disminuía la adherencia a células epiteliales *in vitro*. En 2011, Farfan y col, demostraron que STEC O157:H7 tiene adherencia aumentada cuando la superficie celular está recubierta de fibronectina, laminina y colágeno tipo IV y que la unión a esas proteínas de matriz extracelular (PME) estaba reducida en cepas mutantes de *lpf1*. Esto demuestra que la interacción de LPF1 y PME puede contribuir a la colonización del tracto gastrointestinal de STEC O157:H7 (Figura 3).

El segundo operón, denominado *lpf2*, está localizado en una isla específica de O157 denominada OI-154. A diferencia de *lpf1*, el *locus lpf2* contiene 5 genes (*lpfABCDD'*), carece de un gen homólogo de *lpf1E*, y *lpfD* se encuentra duplicado en cepas O157 (Torres y col., 2004). La mutagénesis del gen *lpfA2* (principal subunidad fimbrial), produjo una reducción en la adherencia en células Caco-2, aunque la adherencia a células HeLa no se vio afectada (Torres y col., 2004). El operón *lpf2* ha sido asociado con adherencia a células epiteliales y su expresión en algunas cepas patógenas de *E. coli* sería importante para el desarrollo de cuadros severos de diarrea (Doughty y col., 2002).

En un estudio realizado por Jordan y col. (2004), se demostró que cuando se inoculaban ovejas y cerdos gnotobióticos con cepas O157:H7 con los genes *lpfA1* y *lpfA2* mutados (uno o ambos *loci*), disminuía la colonización intestinal, además de la persistencia y causaban menos lesión A/E que la

cepa silvestre. Además estos mutantes exhibían un tropismo alterado a las células intestinales humanas. Estos estudios demostraron que los *loci* fimbriales *lpf* eran los primeros genes fuera de LEE en ser identificados que influenciaban el tropismo de STEC O157:H7 por las células intestinales humanas y los autores propusieron que los LPF facilitan la colonización en humanos y/o la persistencia de *E. coli* patógenos en el reservorio animal (Fitzhenry y col., 2006).

Genes homólogos a *lpf* han sido identificados en STEC no-O157. Doughty y col. (2002) encontraron en una cepa STEC O113:H21 LEE-negativa un operón, homólogo a *lpf2*, compuesto por cuatro genes (*lpfABCD*), localizado en OI-154, al igual que *lpf2* de STEC O157:H7, al que llamaron *lpf*_{O113}. La inactivación del gen *lpfA*_{O113} en STEC O113:H21 produce una reducción significativa en la adherencia y en la formación de micro-colonias en células CHO-K1 (del inglés, *Chinese hamster ovary-K1*), y cuando el operón *lpf*_{O113} era introducido en una cepa no fimbriada de *E. coli* K-12, la bacteria mostraba un patrón de adherencia de tipo localizada (no difuso), indicando que la fimbria homóloga a LPF2 puede promover interacciones bacteria-bacteria (Doughty y col., 2002).

En 2009, Torres y col, analizaron la secuencia de ADN de distintos genes *lpfA1* y *lpfA2* e identificaron algunos polimorfismos dentro de *lpfA* que permitieron clasificar la principal subunidad fimbrial en distintas variantes. El gen *lpfA1* fue clasificado en 5 tipos diferentes: *lpfA1-1*, *lpfA1-2* (anteriormente *lpf*_{O26}), *lpfA1-3* (anteriormente denominada *lpfA*_{O157/OI-141}), *lpfA1-4* y *lpfA1-5*, y *lpfA2* en tres: *lpfA2-1* (anteriormente denominada *lpf*_{O113}), *lpfA2-2* (anteriormente denominada *lpfA*_{O157/OI-154}) y *lpfA2-3*.

b) Factor para la adherencia de *E. coli* enterohemorrágico (Efa-1)

Estudiando una cepa STEC O111:NM con alta adherencia *in vitro* aislada de un paciente con SUH, se identificó un gen que si era mutado se observaba una disminución de la adherencia a células CHO (del inglés, *Chinese hamster ovary cells*) comparado con la cepa salvaje, pero el fenotipo de la lesión A/E continuaba siendo el mismo (Nicholls y col., 2000). Este gen denominado *efa1* (por sus siglas en inglés, EHEC *factor for adherence 1*), fue encontrado en una variedad de serotipos de *E. coli eae* positivos pero no en *E. coli eae* negativos (Nicholls y col., 2000). El mismo está presente en una isla de patogenicidad denominada OI-122. El gen *efa1* posee un 97% de similitud con el gen *lifA*, que codifica la proteína denominada linfostatina (LifA) presente en EPEC. LifA inhibe la proliferación de linfocitos y la síntesis de citoquinas proinflamatorias como IL-2, IL-4, IL-5 e interferón gama (IFN- γ) (Abu-Median y

col., 2006), facilitando la colonización de EPEC por modulación de la respuesta inmune de mucosas en el intestino y contribuyendo a la adherencia a las células epiteliales.

STEC O157:H7 poseen una versión truncada del gen cromosomal *efa-1* (*efa-1'*, de 1299 pb, codificado en OI-122 de *E. coli* EDL933). Mutaciones en *efa-1'* de *E. coli* O157:H7, provoca una disminución de la adherencia a células de cultivo pero no afecta la colonización intestinal en terneros (Stevens y col., 2002).

En el plásmido pO157 (ver después) está presente un gen homólogo a *efa-1/lifA* denominado *toxB*. La proteína ToxB comparte un 28% de identidad y un 47% de similitud aminoacídica con la proteína Efa1/LifA. ToxB promueve la adherencia de STEC O157:H7 a células epiteliales intestinales *in vitro* (Tatsuno y col., 2001). Estos mismos autores reportaron que *toxB* influye indirectamente en la adherencia promoviendo la producción y/o secreción de proteínas por el SSTIII que son requeridas para la formación de la lesión A/E. Sin embargo, en modelos animales, utilizando cepas STEC O157:H7, ToxB no fue requerido para la colonización intestinal en terneros ni se observó actividad del tipo linfostatina (Abu-Median y col., 2006). Secuencias ToxB han sido detectadas en numerosas STEC no-O157, aunque su función es desconocida (Tozzoli y col., 2005). Estudios recientes plantean que la presencia de ciertos dominios podrían estar asociados con la adherencia *per se*, actividad linfostatina e inducción de efectores del sistema de secreción tipo III en algunas cepas STEC. Por lo tanto, la elucidación de los dominios funcionales en Efa-1/LifA/ToxB podría ser útil para entender las múltiples funciones de estas proteínas en la patogénesis de cepas STEC (Deacon y col., 2010).

c) Adhesina homóloga a IrgA (Iha)

En la construcción de una biblioteca de ADN de *E. coli* O157:H7, se encontró un gen cromosomal que codificaba para una proteína, similar a la adhesina IrgA (del inglés, *iron-regulated gene A*) de *Vibrio cholerae*, y cuyo producto fue denominado Iha (del inglés, *IrgA homologue adhesin*) (Tarr y col., 2000). Iha es una proteína de membrana externa codificada por un gen localizado en OI-43 y OI-48 (idénticos en el genoma de EDL933). En cambio en las cepas *eae*-negativas está localizado en el locus *selC* (Schmidt y col., 2001). Esta proteína fue hallada en una amplia variedad de serotipos STEC (Toma y col., 2004) y la mutación de *iha* en una cepa O157:H7 resultó en una reducción significativa de la adherencia a células HeLa (Tarr y col., 2000).

d) Adhesina autoaglutinante de STEC (Saa)

Estudiando una cepa STEC O113:H21 LEE-negativa, causante de un brote de SUH en Australia, se encontró que esta cepa poseía una capacidad de adherencia similar a cepas STEC LEE-positivas (Paton y col., 1999). Estudios posteriores permitieron determinar la existencia de un megaplásmido que codifica para una proteína de 516 aminoácidos que fue denominada Saa (del inglés, STEC *autoagglutinating adhesin*). La expresión de Saa en una cepa de *E. coli* (UM109) reveló una capacidad de adherencia aumentada a células Hep-2 respecto de la cepa salvaje. La mutagénesis del gen *saa* en la cepa 98NK2 o la eliminación del megaplásmido, reflejó una reducción significativa en la capacidad de adherencia a células epiteliales. El gen *saa* se encontró en una amplia variedad de serotipos STEC LEE-negativas (Paton y col., 2001; Galli y col., 2010 a), y fue propuesto como posible adhesina de este tipo de cepas. Sin embargo, en estudios posteriores se demostró que cepas con este gen mutado no mostraban una reducción en la capacidad de adherencia comparadas con la cepa salvaje correspondiente, sugiriendo que existen múltiples mecanismos de adherencia en las cepas *saa*-positivas (Toma y col., 2008).

1.7.4. Megaplásmido

Las cepas EHEC normalmente contienen un gran plásmido enterohemorrágico (Mp). Se considera que el Mp está fuertemente implicado en la patogénesis de las infecciones por STEC, ya que en este se encuentran codificados diversos factores de virulencia. En el caso de los aislamientos de *E. coli* O157:H7 este plásmido de virulencia es llamado pO157. Este plásmido es no conjugativo y posee una estructura dinámica que incluye diferentes elementos genéticos móviles como transposones, profagos, secuencia de inserción y partes de otros plásmidos. Este plásmido contiene los genes/operones *ehxA*, *toxB*, *etpC-O*, *espP* y *katP* entre otros (Schmidt y col., 1995; Lim y col., 2010). El gen *ehxA* codifica la producción de una enterohemolisina (EHEC-Hly). Esta proteína, perteneciente a la familia de las citolisinas formadoras de poros, provoca la liberación de la hemoglobina presente en los glóbulos rojos durante la infección, proveyendo a las bacterias de una fuente de hierro. Además, se encontró que EHEC-Hly es citotóxica para células endoteliales y pueden contribuir al desarrollo de SUH; los genes *etpC* al *etpO*, codifican una vía de secreción tipo II; *espP*, una serina proteasa extracelular que degrada factor V de la coagulación y complemento, y podría contribuir con la hemorragia de mucosas observada en pacientes con CH; *katP* codifica para una catalasa-peroxidasa

que ayudaría a *E. coli* O157 a colonizar el intestino del huésped reduciendo el estrés oxidativo (Lim y col., 2010).

Los plásmidos en cepas STEC no-O157, como los serotipos O26, O103, O111 y O145, tienen contenido de genes similares a la de pO157, con algunas variaciones. En contraste, el pO113 presente en STEC O113:H21 LEE-negativo, contiene diferentes factores de virulencia, incluyendo *subAB* y *saa*, pero lleva *espP* y *ehx* (Paton y col., 1999)

1.8. Patogénesis de STEC

Al igual que con otras infecciones entéricas, el mecanismo de patogénesis consiste en la colonización del intestino y producción de daño al hospedador debido a la producción de toxinas. Este mecanismo involucra múltiples procesos y una compleja interacción entre factores bacterianos y del huésped, que le permiten a STEC sortear los mecanismos de defensa del hospedador y establecerse en el intestino.

Es conocido que la exposición de ciertas bacterias entéricas, incluyendo *E. coli*, a bajos pH induce mecanismos de tolerancia al ácido. STEC posee al menos tres sistemas distintos de resistencia en medios ácidos, los que le permitirían sobrevivir a la acidez del estómago (pH 1 a 3) y del intestino (pH 4,5 a 7 con alta concentración de ácidos grasos volátiles) y poseer una baja dosis infectiva (de 10-100 UFC) (Lin y col., 1996).

En humanos, STEC coloniza el intestino grueso y según estudios *in vitro*, en cepas LEE-positivas, la adherencia e interacción inicial con células epiteliales esta mediada por LPF1 (Farfan y col., 2012). La unión de LPF1 a proteínas de la matriz extracelular como fibronectina, laminina y colágeno tipo IV contribuiría a la colonización del tracto gastrointestinal de STEC O157:H7 (Farfan y col., 2011).

La inflamación es una característica destacada en la lesión intestinal provocada por STEC O157:H7, y la flagelina H7 juega un rol fundamental en la activación de señales pro-inflamatorias en las células epiteliales colónicas. La flagelina se une al TLR-5 (del inglés, *toll like receptor*) llevando a la activación de NF- κ B y aumento de la secreción de IL-8 (también las toxinas Shiga inducen la producción de IL-8 por las células epiteliales colónicas). Luego de la interacción inicial con el enterocito, se produce la denominada lesión A/E (ya explicado). Las toxinas Shiga una vez liberadas dentro del lumen intestinal, son translocadas a la circulación sanguínea y se diseminan a otros órganos. Este proceso es poco conocido, pero la translocación de las Stx1 ocurriría por vía transcelular y Stx2 por vía paracelular.

Este transporte se encuentra facilitado por la transmigración de neutrófilos que aumentan la permeabilidad paracelular. El daño del epitelio intestinal por el efecto directo de la toxina y los lipopolisacáridos bacterianos podría contribuir a la translocación de la toxina hacia el torrente sanguíneo (figura 3). La toxina produce un daño en las células endoteliales de los vasos sanguíneos provocando diarrea sanguinolenta. Luego que Stx cruza la barrera epitelial, entra a la circulación sanguínea y aparentemente, las toxinas alcanzan el riñón y el resto del sistema transportadas por los neutrófilos. Una vez fijadas a su receptor específico Gb3 en la célula blanco, las toxinas son endocitadas. Las vesículas endosómicas pasan por el aparato de Golgi y son transportadas al RE antes de ser transportadas al citosol. Durante este proceso, la subunidad A de 32 Kda es escindida proteolíticamente, liberando un fragmento A1 de 28 Kda con actividad catalítica y un péptido A2. El fragmento A1 remueve un único residuo de adenina de la subunidad ribosomal 28S, lo que resulta en una inhibición irreversible de la síntesis proteica y la consecuente apoptosis (Paton y col., 1998).

La mayor parte de las lesiones histopatológicas observadas en las CH y en el SUH, son consecuencia de la interacción de Stx con células endoteliales. Estas lesiones consisten en el engrosamiento de la pared vascular con edema endotelial y acumulación de proteínas y detritos celulares en la capa subendotelial. Este daño provoca, acumulación plaquetaria, hemólisis debido al estrechamiento de la luz capilar asociada a daño oxidativo, lesiones isquémicas y reclutamiento de leucocitos polimorfonucleares, agravando el daño endotelial y la alteración de la función del órgano afectado.

La expresión de Gb3 varía entre los distintos tejidos y tipos celulares. El endotelio glomerular renal de los humanos expresa altos niveles de Gb3, particularmente en la región cortical. La oclusión capilar, debida a la acción de Stx, resulta en la disminución de la tasa de filtración glomerular, con la consecuente retención de urea, creatinina y ácido úrico. Es posible observar lesiones trombóticas en el intestino, sistema nervioso central, páncreas, miocardio y retina. El consumo de plaquetas, producto de la activación plaquetaria y la acción directa de la toxina, produce trombocitopenia y pueden observarse hemorragias espontáneas.

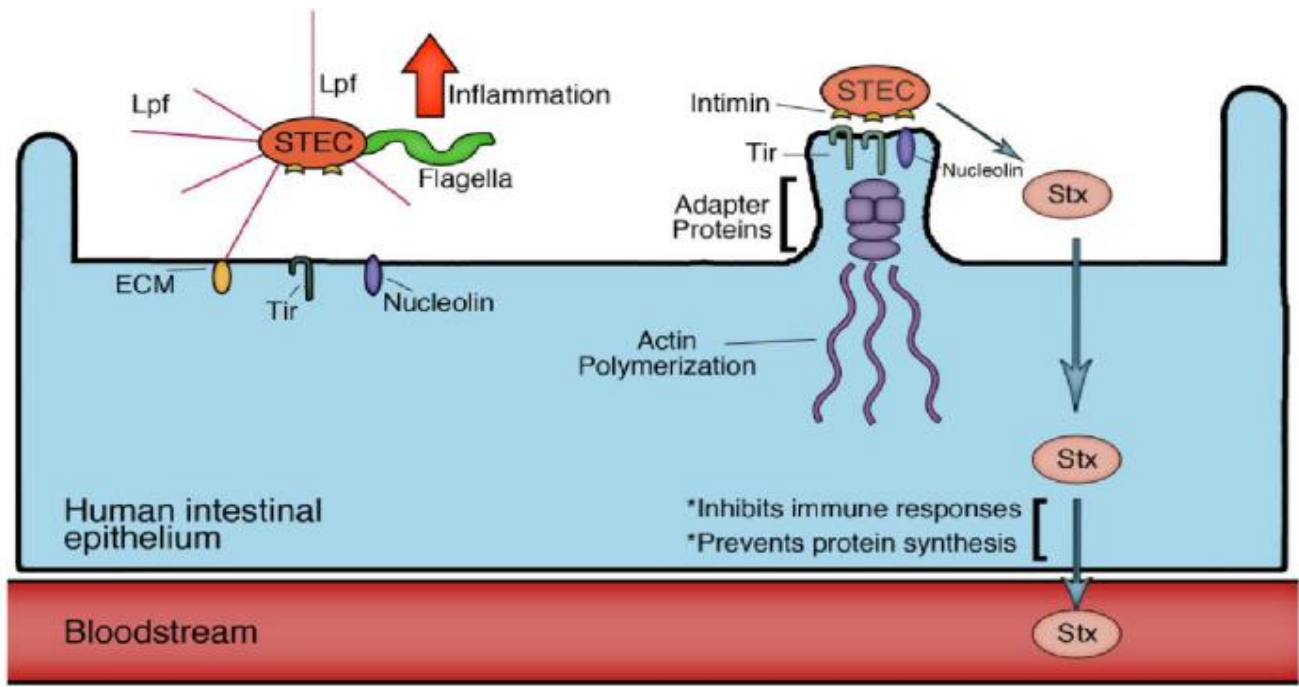


Figura 3. El diagrama muestra una célula del epitelio intestinal humano mostrando las primeras etapas de la colonización por STEC en el lumen. STEC O157 y no-O157 interactúan con el intestino a través de las fimbrias LPF; esto es seguido por la formación de lesiones A/E. La producción de Stx ocurre en el tracto intestinal, y la translocación a través de la luz intestinal al torrente sanguíneo resulta en su distribución a los órganos diana, como los riñones (Adaptado de Farfan y col., 2012).

1.9. Diagnóstico de la infección por STEC

El diagnóstico temprano de las infecciones por STEC se justifica por varias razones:

- Permite el seguimiento de los pacientes individuales para controlar el desarrollo de posibles complicaciones como el SUH e iniciar el tratamiento oportuno (la expansión de volumen tempranamente en el curso del SUH debido a STEC O157 disminuye el daño renal) (Ake y col., 2005).
- Ayuda a evitar innecesarios procedimientos invasivos de diagnóstico y tratamiento (como cirugía en pacientes con dolor abdominal severo o diarrea sanguinolenta).
- Ayuda a la realización de investigaciones epidemiológicas para descubrir nuevos casos y localizar la fuente de infección, pudiendo aplicar medidas destinadas a interrumpir su propagación.

Para ello es necesario que las técnicas diagnósticas sean rápidas, sensibles y simples de aplicar.

Se utilizan tres criterios diagnósticos para establecer la asociación entre enfermedad e infección por STEC: aislamiento y caracterización del patógeno; detección de Stx libre en materia fecal; y detección de anticuerpos anti-Stx o anti-LPS en suero.

1.10. Sub-tipificación molecular

El estudio epidemiológico molecular de las enfermedades infecciosas tiene por objeto determinar la relación clonal que existe entre varios aislamientos de una misma especie (Tenover y col., 1995). Esta información es muy útil, sobre todo cuando se producen brotes epidémicos, porque permite determinar el número de clones circulantes, identificar la fuente de contaminación o reservorio y los vehículos de transmisión, evaluar la eficacia de las medidas de control dirigidas a evitar la diseminación de clones y diferenciar entre infección y recidiva, entre otros beneficios (Coll y col., 2005).

Los métodos de tipificación se clasifican en dos grandes grupos: fenotípicos y genotípicos. Dentro de las técnicas genotípicas utilizadas para sub-tipificar *E. coli*, encontramos tres grandes grupos: aquellas basadas en PCR, las basadas en restricción enzimática y las combinadas. A continuación se enumeran algunos ejemplos.

- Basadas en PCR
 1. RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA*). En la misma se amplifican por PCR secuencias al azar del ADN genómico, obteniéndose patrones de bandas característicos.
 2. ERIC-PCR (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus PCR*). Las secuencias ERIC son secuencias palindrómicas imperfectas de 127 pb, altamente conservadas y localizadas en regiones no codificantes presentes en miembros de la familia *Enterobacteriaceae*. En el genoma de *E. coli* existen entre 30 y 50 copias de la secuencia ERIC, y la capacidad de formar asas sería la clave para explicar el alto nivel de conservación de las mismas (Wilson y col., 2006). Estos elementos se pueden amplificar por PCR, con la finalidad de generar un patrón electroforético de bandas basado en la frecuencia y orientación de secuencias ERIC del genoma bacteriano. Este método tiene la ventaja de ser simple, rápido y económico.
- Basadas en restricción enzimática
 1. PFGE (*Pulsed-field gel electrophoresis*). La técnica de electroforesis en gel de campo pulsado es una técnica altamente reproducible que consiste en generar fragmentos del cromosoma bacteriano utilizando enzimas de restricción que cortan el ADN en 20-25 partes, las cuales son separadas por electroforesis multidireccional. Esta técnica tiene el inconveniente de que es muy laboriosa y requiere más de un día para obtener y analizar

los patrones, pero es considerada el “estándar de oro” para la sub-tipificación de *E. coli* O157, debido a que posee un elevado poder de discriminación y una excelente reproducibilidad, y es aceptada como la técnica estándar en investigaciones epidemiológicas. El uso de esta técnica ha permitido caracterizar aislamientos relacionados a brotes, comparar aislamientos esporádicos con cepas epidémicas, etc. (Giammanco y col., 2002).

- Combinadas

1. MLST (*Multilocus sequence typing*). Con este método se detectan variaciones en la secuencia de ADN de genes seleccionados (generalmente *housekeeping*). Esta técnica está desarrollada y diseñada para identificar clones y/o líneas clonales. Es un marcador molecular de aplicación en epidemiología global o a largo plazo, aunque ha sido utilizado para dar respuesta a interrogantes planteados de epidemiología local o a corto plazo (caracterización de brotes, diferenciación de recidivas, reinfecciones y/o fallos terapéuticos, etc.). Este método es altamente reproducible y con alto poder discriminatorio. Sin embargo, Noller y col. (2003), demostraron la falta de diversidad genética entre las cepas de *E. coli* O157 (incluso cepas claramente diferentes por PFGE)

OBJETIVOS

Justificación del estudio y objetivos

- Las enfermedades diarreicas agudas constituyen una de las causas principales de enfermedad y muerte en niños a nivel mundial, siendo la segunda causa de muerte en menores de 5 años en nuestro país.
- *Escherichia coli* productores de toxina Shiga es una causa importante de diarrea sanguinolenta y SUH en niños pequeños, pero no son rutinariamente diagnosticadas en todos los laboratorios de Microbiología. Por esta razón, es importante conocer la prevalencia de STEC y de otros patógenos en nuestro país para tomar medidas terapéuticas adecuadas y de prevención.
- La implementación de medidas de control y el planeamiento de estrategias de prevención requiere una coordinación intra e intersectorial con grupos multidisciplinarios de intervención que comprenda salud humana, salud ambiental, vigilancia epidemiológica, sanidad animal y vegetal, redes de laboratorio y educación de la comunidad, siendo fundamental el conocimiento de la frecuencia relativa de los distintos agentes productores de diarrea infantil.

Por esta razón, me planteo:

OBJETIVO GENERAL

- Determinar el perfil fenotípico, genotípico y la relación clonal de las cepas STEC recuperadas de pacientes pediátricos con diarrea sanguinolenta y síndrome urémico hemolítico atendidos en el Hospital “Sor María Ludovica” de La Plata.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la prevalencia de STEC en muestras fecales de niños con diagnóstico clínico de diarrea aguda sanguinolenta y SUH.
- Describir la población en la cual se detectó STEC, según grupo etario y su distribución estacional.
- Caracterizar fenotípicamente las cepas aisladas mediante pruebas bioquímicas, serotipificación somática y flagelar y resistencia a los antimicrobianos de importancia en salud pública.

- Caracterizar genótipicamente las cepas aisladas, determinando la portación de los genes que codifican los principales factores de virulencia de STEC como *stx*, *eae*, *ehxA*, y adhesinas putativas.
- Establecer la relación clonal de las cepas de *E. coli* O157:H7 mediante ERIC-PCR y PFGE.

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Diseño experimental y población estudiada

Se realizó un estudio retrospectivo, observacional y analítico. Se estudiaron pacientes ambulatorios u hospitalizados, que fueron asistidos en el Hospital Interzonal especializado en Pediatría “Sor María Ludovica” de La Plata, con motivo de presentar diagnóstico clínico de diarrea aguda sanguinolenta o síndrome urémico hemolítico.

El mencionado nosocomio, es una institución dedicada a la atención de alta, media y baja complejidad pediátrica en la Provincia de Buenos Aires, y funciona como Unidad Centinela para la vigilancia de SUH en la región.

Definiciones

- Diarrea aguda o gastroenteritis: disminución de la consistencia de las deposiciones (desligadas o líquidas) y/o aumento de la frecuencia de las evacuaciones (= ó > a tres en un día), con o sin fiebre o vómitos, de menos de 14 días de evolución.
- Diarrea sanguinolenta: es aquella que presenta en materia fecal sangre fresca o estrías de sangre por observación directa o por interrogatorio a la madre.
- SUH clínico: enfermedad de comienzo agudo con anemia hemolítica microangiopática, daño renal de grado variable, con compromiso neurológico frecuente que sigue a un episodio de diarrea generalmente con sangre en un niño previamente sano (SAP, 1995).

Muestras analizadas

Desde el 1 de marzo de 2006 al 30 de diciembre de 2012, se estudiaron 1051 muestras de materia fecal obtenidas por evacuación espontánea (una por paciente). Novecientas cuarenta y cuatro muestras correspondieron a pacientes con diarrea aguda, de los cuales 731 (77,4%) presentaban diarrea aguda sanguinolenta y 213 (22,6%) diarrea no sanguinolenta (por observación microscópica) al momento de la recolección de las mismas. Ciento siete muestras fueron obtenidas de pacientes con diagnóstico de SUH. Las muestras fueron procesadas antes de las 2 horas de recogida o conservadas en medio de transporte Cary-Blair y refrigeradas a 4°C hasta su procesamiento. Se consideraron

muestras inaceptables cuando: a) Tenían más de 2 horas de recolectada y no estaban en medio de conservación y transporte; b) Muestra contaminada con orina; c) Hisopo sin muestra, d) Muestra sin datos del paciente; e) Muestras que no presentaron crecimiento bacteriano una vez procesadas en el laboratorio.

Criterios de inclusión

Para la selección del caso se estipularon las siguientes condiciones: persona previamente sana, menor a 14 años, con diagnóstico presuntivo de diarrea sanguinolenta aguda y/o caso clínicamente confirmado de SUH post-entérico, con no más de 14 días de evolución al momento de la toma de muestra.

Criterios de exclusión

a) Niños con diarrea de más de 14 días de evolución; b) Antecedentes de enfermedad intestinal inflamatoria crónica (colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn u otra enfermedad preexistente que pueda dar deposiciones con sangre; c) Paciente con sospecha o confirmación de infección nosocomial; d) pacientes inmunocomprometidos; e) paciente con SUH familiar, recurrente, secundario no infeccioso (drogas, postransplante, etc.) o asociado con infección por *Streptococcus pneumoniae*.

Registro de la información

Se confeccionó una base de datos para todos los pacientes donde se registró: N° de caso, fecha de coprocultivo (semana epidemiológica), apellido y nombre, edad al momento de la consulta, sexo, diagnóstico clínico y domicilio.

3.2. Plan de trabajo

El mismo se desarrolló en cuatro etapas, a saber:

- El procesamiento de muestras, detección de STEC, aislamiento y conservación de las cepas se realizó entre los años 2006 y 2012.
- Caracterización fenotípica de los aislamientos portadores de *stx*₁, *stx*₂ y/o *rfb*_{O157} recuperadas durante el período 2006-2012.

- Caracterización genotípica de las cepas de STEC recuperadas durante el período 2006-2012.
- Sub-tipificación molecular de las cepas O157:H7 recuperadas durante el período 2006-2012.

3.2.1. Cultivo microbiológico primario y aislamiento de STEC

Las muestras fueron procesadas en el Laboratorio de Microbiología del Hospital “Sor María Ludovica” por técnicas microbiológica estandarizadas (Giugno y Oderiz., 2010). A las mismas se les investigó la presencia de los siguientes patógenos entéricos: *Shigella*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Aeromonas*, *Yersinia*, EPEC, EIEC y STEC (datos no mostrados).

Para la búsqueda de STEC, las muestras de materia fecal se sembraron de forma directa en (según disponibilidad): medio CHROMagar™O157 (CHROMagar, Paris, Francia) o agar O157:H7 ID (bioMerieux, Marcy l’Etoile, Francia). Para las muestras de pacientes con diagnóstico de SUH, además de la siembra directa, se realizó enriquecimiento por 4 horas a 37°C en caldo tripticasa soja (CTS) (Difco Laboratories, Detroit, MI, EE.UU.) adicionado de cefixima 0,05 mg/l y telurito de potasio 2,5 mg/l (bioMérieux) y luego se sembró una ansada del caldo en placas de agar MacConkey con sorbitol (SMAC) (Difco). Las placas se incubaron en estufa a 37°C de 24 a 48 horas (OPS-INEI, 2011)

3.2.2. Preparación de las muestras de ADN bacteriano

A partir de placas de agar cromogénico para *E. coli* O157 o SMAC, se realizaron pools de 10 colonias con fenotipo de *E. coli* que se re-suspendieron en 150 µl de solución de Tritón X-100 al 1% (Merck, Alemania) en buffer TE 1X (10 mM Tris: 1mM EDTA, pH 8,0), a la vez que se repicaron en placa de agar MacConkey grillada. Una ansada de la zona de crecimiento confluyente también fue re-suspendida en un segundo tubo con la misma solución de extracción. Luego de calentar durante 10 minutos a 100°C en bloque térmico, los tubos se centrifugaron a 10.000 rpm por 10 minutos. Se separó el sobrenadante para ser utilizado como blanco en la técnica de tamizaje de STEC por PCR.

3.2.3. Detección de STEC mediante tamizaje por PCR múltiple.

Para determinar la presencia de STEC en los cultivos analizados, se buscó la presencia de los genes *stx*₁, *stx*₂ y *rfb*_{O157} por medio de una PCR múltiple en tiempo final previamente validada (Leotta y col., 2005). Los oligonucleótidos iniciadores utilizados figuran en la tabla 3. La mezcla de reacción contiene

buffer PCR 10X (Invitrogen Life Technologies, Brasil), MgCl₂ 25 mM (Invitrogen), mezcla de dNTPs 10 mM (Invitrogen, California, EE.UU.), mezcla de oligonucleótidos específicos (Invitrogen, EE.UU.), *Taq* ADN polimerasa (Invitrogen) y 2 µL de ADN molde. Las concentraciones y el programa de amplificación utilizados se describen en el anexo 1. Como control positivo y negativo se utilizó ADN templado de las cepas de referencia de *E. coli*, EDL933 (*stx*₁/*stx*₂/*rfb*_{O157}) y ATCC 25922 sin factores de virulencia, respectivamente. Se utilizó un termociclador modelo T100™ *Thermal Cycler* (Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU). Los productos de amplificación se analizaron en geles de agarosa (BioRad) al 2% en *buffer* TAE (Tris-ácido acético-EDTA) 1X adicionado con 0.5 µg/ml de bromuro de etidio (Promega). Como *buffer* de siembra se utilizó una solución de xilenocianol (BioRad) 0.25%, azul de bromofenol (BioRad) 0.25% y glicerol (Merck) al 20% en agua. La corrida electroforética se efectuó a 100 volts durante 40 min en una cuba electroforética modelo *Wide Mini-Sub Cell GT Systems* (BIO-RAD) con una fuente de poder PowerPac™ Basic PowerSupply (BIO-RAD). Se utilizó un marcador de peso molecular 100 pb (BioRad).

Tabla 3. Secuencia de oligonucleótido y tamaño de los productos de amplificación utilizados para detección de STEC

| Gen blanco | Cebador | Secuencia de oligonucleótidos (5'-3') | Amplificación (pb) | Referencia |
|----------------|---------|---------------------------------------|--------------------|---------------------|
| <i>stx1</i> | Stx1a | GAAGAGTCGTGGGATACG | 130 | Pollard y col. 1990 |
| | Stx1b | AGCGATGCAGCTATTAATAA | | |
| <i>stx2</i> | Stx2a | TTAACCACACCCACCGGCAGT | 346 | Pollard y col. 1990 |
| | Stx2b | GCTCTGGATGCATCTCTGGT | | |
| <i>rfbO157</i> | O157F | CGGACATCCATGTGATATGG | 259 | Paton y col. 1998 |
| | O157R | TTGCCTATGTACAGCTAATCC | | |

3.2.4. Aislamiento y conservación de las cepas STEC

En aquellos pools donde se detectó presencia genes que codifican para toxina Shiga, se realizó nuevamente la PCR múltiple en cada colonia integrante del pool, a fin de aislar la colonia positiva. Si el lisado bacteriano confluyente dio señal positiva y fue negativa en el pool de colonias, se realizó un nuevo aislamiento de colonias desde la zona de crecimiento confluyente y se prepararon nuevos pools de colonias. Una vez detectada la colonia donde se obtuvo señal positiva, ésta se repicó en SMAC y después de 18 horas de incubación a 37°C, los aislamientos fueron conservados en CTS con 20% de glicerol a -70°C para su posterior caracterización.

3.3. Caracterización fenotípica de los aislamientos de STEC

3.3.1. Identificación bioquímica

Para la identificación de los aislamientos se utilizaron las siguientes pruebas bioquímicas (Ewing, 1986; MacFaddin, 2003): catalasa, citocromo oxidasa, fermentación de glucosa, lactosa y/o sacarosa y producción de ácido sulfhídrico (agar T.S.I., Britania), utilización de Citrato de sodio (agar citrato de Simmons, Britania), actividad β -glucuronidasa (Colibrit Test, Britania), movilidad, decarboxilación de ornitina y producción de indol (medio MIO, Difco, Becton-Dickinson), producción de pigmento amarillo (agar soya tripticasa, Britania). Cada aislamiento fue inoculado en caldo base con púrpura de bromocresol (Becton-Dickinson) conteniendo 1% de los siguientes carbohidratos: sorbitol, celobiosa, sacarosa, rafinosa, ramnosa y dulcitol. Las cepas de *E. coli* O157:H7 se clasificaron en 4 biotipos, según la capacidad de fermentar los azúcares rafinosa, dulcitol y ramnosa, según Krishnan y col. (1987): biotipo A (fermenta rafinosa), biotipo B (fermenta rafinosa y dulcitol), biotipo C (fermenta rafinosa, dulcitol y ramnosa) y biotipo D (fermenta rafinosa y ramnosa).

Los aislamientos fueron además identificados utilizando el sistema comercial Vitek2 Compact System (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia) siguiendo los procedimientos recomendados por el fabricante. Para el control de calidad se ensayaron cinco cepas de referencia: *E. coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. Los análisis se realizaron utilizando la tarjeta de VITEK 2 ID-GN.

3.3.2. Serotipificación de STEC

Los aislamientos de *E. coli* portadores de *stx*₁ y/o *stx*₂ y/o *rfb*_{O157} fueron caracterizados serológicamente mediante la técnica de aglutinación utilizando antisueros específicos.

a) Determinación del antígeno somático O

Los aislamientos de STEC se repicaron en agar soya tripticasa (ATS) e incubaron durante 24 horas a 37°C. Luego de la incubación, se efectuó la aglutinación en portaobjetos con antisueros monovalentes O26, O145 y O157 provistos por el Instituto Nacional de Producción de Biológicos-ANLIS "Dr. Carlos Malbrán". La serotipificación de los aislamientos distintos de estos serogrupos, se realizó en el Laboratorio de Inmunoquímica y Biotecnología, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNCPBA. En estos

casos, la determinación del antígeno O se realizó mediante el método descrito por Guinée y col. (1981) y modificado por Blanco y col. (1996). Los antisueros O fueron obtenidos del Laboratorio de Referencia de *E. coli* de la Universidad de Santiago de Compostela, Lugo, España. Sucintamente, los aislamientos desarrollados en ATS a 37°C, se suspendieron en 2 ml de solución salina, ajustándose el inóculo por comparación con el tubo N°6 de la escala de McFarland (aprox. $1,8 \times 10^9$ UFC/ml). Se incubaron en baño de agua a ebullición por 60 minutos. Una vez frío, se agregó a cada tubo 2 ml de solución salina formolada (0,5 % v/v) conteniendo violeta de genciana (0,005 p/v). Para la determinación del serogrupo orientativo, 50 µl de antisueros polivalentes (A, G, H, I, J, K, M, N, O) se enfrentaron con 50 µl de cada aislamiento en placas de pocillos de fondo en “V”. Se incubaron durante 24 horas. La formación de botón indicó que el aislamiento no fue reconocido por el antisuero en estudio. Cuando las bacterias permanecieron en suspensión en presencia del antisuero, el resultado se consideró positivo, enfrentándose entonces a los sueros monovalentes que conforman el policlonal (50 µl de suspensión bacteriana con 50 µl de cada antisuero monovalente) para el seroagrupado definitivo. Los aislamientos que fueron no reactivos para los antisueros O ensayados fueron clasificados como “O no tipable” (Ont).

b) Determinación del antígeno flagelar H

Se utilizó la técnica de aglutinación en tubo con antisuero anti-H descrita por Ørskov y Ørskov (1984). Previo a la serotipificación flagelar, se estimuló la movilidad de cada cepa mediante 3 a 6 pasajes en medio de Craigie incubando a 37°C por 18 horas. Posteriormente se sembró una ansada del cultivo en 8 ml de caldo Cerebro Corazón. Luego de incubar por 6 horas a 37°C, se adicionó igual volumen de solución fisiológica formolada al 1% (v/v). Posteriormente, se enfrentaron 50 µl de cada antisuero con 500 µl de suspensión bacteriana en tubos de hemólisis. Se efectuó la lectura por precipitación, luego de incubar 1 hora a 50°C. La presencia o ausencia del antígeno H7 fue determinada en todos los aislamientos que expresaron el polisacárido O157. El suero anti-H7 fue provisto por el INPB-ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”. La serotipificación de los aislamientos distintos de H7, se realizó en el Laboratorio de Inmunoquímica y Biotecnología, FCV, UNCPBA.

3.3.3. Sensibilidad antimicrobiana.

Para la determinación de la susceptibilidad de los aislamientos a diferentes antimicrobianos se utilizó la técnica de difusión en agar Mueller-Hinton con discos (técnica de Kirby y Bauer) de acuerdo con las recomendaciones del *Clinical and Laboratory Standards Institute*, documento M100-S23 (2013). Se evaluó la susceptibilidad a los siguientes antimicrobianos: ampicilina (10 µg), amoxicilina/ácido clavulánico (20/10 µg), cefalotina (30 µg), cefoxitina (30 µg), ceftazidima (30 µg), cefotaxima (10 µg), piperacilina/tazobactama, imipenem (10µg), meropenem (10 µg), gentamicina (10 µg), ampicacina (30 µg), ácido nalidíxico (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), trimetoprima-sulfametoxazol (1,25/23,75 µg), nitrofurantoína (300 µg), fosfomicina (200 µg), tetraciclina (30 µg) y colistin (10 µg). Se utilizaron como cepas control: *E. coli* ATCC 25922 y *P. aeruginosa* ATCC 27853. La interpretación de resultados se realizó según los puntos de corte indicados por los documentos M100-S23, tabla 2a.

3.3.4. Detección de la producción de toxinas Shiga por enzimoimmunoensayo.

Para la detección de toxina Shiga producida por las cepas de STEC, se trabajó directo desde las colonias y se utilizó una técnica comercial de ELISA (Premier™ EHEC, Meridian Diagnostics, Cincinnati, Ohio), que detecta, aunque no discrimina, tanto la Stx1 como Stx2. Las cepas se sembraron en 10 ml de caldo MacConkey, se incubaron a 35°C por 16-24 horas y se siguió el procedimiento recomendado por el fabricante. La lectura de los resultados se realizó en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 450 nm (negativo DO <0,180, positivo DO >0,180).

3.3.5. Caracterización de fenotipo hemolítico

Para la caracterización de cepas productoras de EHEC-HlyA (enterohemolisina), las cepas STEC fueron crecidas en placas con agar base triptosa suplementado con 10 mM de Cl₂Ca y 5% de sangre ovina desfibrinada, lavada tres veces con solución salina buferada (PBS 1X) estéril pH 7,2. Como control se emplean placas de agar base triptosa con 5% de sangre ovina desfibrinada, sin lavar y sin el agregado de Cl₂Ca. Las placas fueron incubadas a 37°C y observadas a las tres horas para la detección de hemólisis por α-hemolisina (α-Hly) y a las 18 h, para la segunda lectura indicando presencia de la hemolisina de STEC (Beutin y col., 1989). Se utilizó la cepa LaMA 92 (O157:H7) como control positivo y *E. coli* 25922 como control negativo.

3.4. Caracterización genotípica de los aislamientos de STEC.

3.4.1. Preparación de la muestras de ADN

Los aislamientos conservados a -70°C se sembraron en CTS e incubaron a 37°C durante 24 horas y luego una ansada se estrió en SMAC y se incubó durante 18 h a 37°C . Una colonia se resuspendió en $150\ \mu\text{l}$ de solución de Tritón X-100 al 1% en *buffer* TE 1X. Luego de calentar durante 10 minutos a 100°C en bloque térmico, los tubos se centrifugaron a 10.000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante, que contiene el ADN, se separó y almacenó a -20°C por un periodo máximo de 3 meses. El ADN así obtenido se utilizó como molde en las reacciones de PCR descritas a continuación.

3.4.2. Confirmación genotípica de *E. coli* O26, O103, O111, O121, O145 y O157 por PCR múltiple.

Se utilizó la técnica descrita por Monday y col. (2007). En la tabla 4 se describen los oligonucleótidos utilizados para la detección de cada gen. Las concentraciones de los reactivos y el programa de PCR utilizado se describen en el anexo 1. Como control positivo se utilizó una mezcla de extractos de ADN de las siguientes cepas de *E. coli*: LaMA103 (O121:H19), LaMA67 (O103:H25), LaMA36 (O111:NM), LaMA40 (O157:H7), LaMA33 (O26:H11) y LaMA63 (O145:NM).

Tabla 4. Secuencia de oligonucleótidos y tamaño de los productos de amplificación utilizados para confirmación molecular de los serotipos somáticos y presencia del gen *eae*.

| Gen | Cebador | Secuencia de oligonucleótidos (5'3') | Amplión (pb) | Referencia |
|---------------------|----------|--------------------------------------|--------------|--------------------|
| <i>eae</i> | SRM103 | GTTCACTGGACTTCTTATTACCG | 482 | Monday y col. 2007 |
| | SRM104 | ATCGTCACCAGAGGAATCG | | |
| 16S | VMP5 | AGAAGCACCGGCTAACTC | 204 | Monday y col. 2007 |
| | VMP6 | CGCATTTCACCGCTACAC | | |
| WZX _{O26} | 5'O26 | ACTCTTGCTTCGCCTGTT | 268 | Monday y col. 2007 |
| | 3'O26 | CAGCGATACTTTGAACCTTAT | | |
| WZX _{O103} | 5'O103 | TATCCTTCATAGCCTGTTGTT | 320 | Monday y col. 2007 |
| | 3'O103 | AATAGTAATAAGCCAGACACCTG | | |
| WZX _{O111} | 5'O111.3 | GTTGCGAGGAATAATTCTTCA | 829 | Monday y col. 2007 |
| | 3'O111.2 | CCATAGATATTGCATAAAGGC | | |
| WZX _{O121} | 5'O121 | GTAGCGAAAGTTAGACTGG | 651 | Monday y col. 2007 |
| | 3'O121 | ATGGGAAAGCTGATACTGC | | |
| WZX _{O145} | 5'O145.6 | TTGAGCACTTATCACAAGAGATT | 418 | Monday y col. 2007 |
| | 3'O145.B | GATTGAATAGCTGAAGTCATACTAAC | | |
| WZX _{O157} | 5'O157 | GCTGCTTATGCAGATGCTC | 133 | Monday y col. 2007 |
| | 3'O157 | CGACTTCACTACCGAACACTA | | |

3.4.3. Detección del gen *fliC_{H7}*

Para la detección del gen *fliC_{H7}* se utilizó la técnica descrita por Gannon y col. (1997). En la tabla 5 se describen los oligonucleótidos utilizados. Las concentraciones de los reactivos y el programa de PCR utilizado se describen en el anexo 1. Como control positivo y negativo se utilizó ADN templado de las cepas *E. coli* LaMA40 (O157:H7) y *E. coli* ATCC 25922 respectivamente.

Tabla 5. Secuencia de oligonucleótido utilizados para la detección del gen *fliC_{H7}*.

| Gen | Cebador | Secuenciade oligonucleotidos (5'-3') | Amplicón (pb) | Referencia |
|--------------------------|----------|--------------------------------------|---------------|---------------------|
| <i>fliC_{H7}</i> | FLICH7-F | GCGCTGTCGAGTTCTATCGAGC | 625 | Gannon y col., 1997 |
| | FLICH7-R | CAACGGTGACTTTATCGCCATTCC | | |

3.4.4. Detección de los genes *ehxA*, *saa*, *iha*, *efa/lifA*, *toxB*, *lpfA1*, *lpfA2*, *cdt-V*, *subAB*, y *astA*.

En todos los aislamientos de STEC fue testeada por PCR la presencia de los siguientes genes de virulencia: *ehxA* y *saa* fueron detectados según la metodología descrita por Paton y col. (2002); la presencia de genes codificantes de adhesinas putativas *iha* (Schmidt y col., 2001), *efa/lifA* (Nicholls y col., 2000) y *toxB* (Tatsuno y col., 2001) de acuerdo con las referencia citadas; las distintas variantes del gen *lpfA1* y *lpfA2* según metodología reportada por Torres y col. (2009); la presencia de genes codificantes de toxinas *cdt-V* (Cergole-Novella y col., 2007), *subAB* (Paton y col., 2005) y *astA* (Yamamoto y col., 1996) de acuerdo con las referencias citadas. En la tabla 6 se describen los oligonucleótidos utilizados. Como control positivo se utilizó ADN templado de *E. coli* LaMA40 serotipo O157:H7 (*eae*, *ehxA*, *efa1*, *iha*, *toxB*, *lpfA1-3*, *lpfA2-2*), *E. coli* LaMA1070 serotipo O113:H21 (*lpfA2-1*, *50ubAB*, *saa*), *E. coli* LaMA33 serotipo O26:H11 (*lpfA1-2*), EPEC 2348/69 serotipo O127:H6 (*lpfA1-1*), *E. coli* LaMA1033 serotipo O91:H21 (*cdt-V*) y EIEC LaMA1083 (*astA*). Las concentraciones de los reactivos y los programas de PCR utilizados se describen en el anexo 1.

Tabla 6. Secuencias de oligonucleótidos utilizados para caracterizar genótipicamente los aislamientos de STEC.

| Gen | Cebador | Secuencia de oligonucleótidos (5'-3') | Amplificación (pb) | Referencia |
|----------------|------------|---------------------------------------|--------------------|-----------------------------|
| <i>ehxA</i> | hlyAF | GCATCATCAAGCGTACGTTCC | 534 | Schmidt y col. 1995 |
| | hlyAR | AATGAGCCAAGCTGGTTAAGCT | | |
| <i>saa</i> | SAADF | CGTGATGAACAGGCTATTGC | 119 | Paton y Paton. 2002 |
| | SAADR | ATGGACATGCCTGTGGCAAC | | |
| <i>iha</i> | iha-I | CAG TTC AGT TTC GCA TTC ACC | 1305 | Toma y col. 2009 |
| | iha-II | GTA TGG CTC TGA TGC GAT G | | |
| <i>toxB</i> | toxB.911F | ATA CCT ACC TGC TCT GGA TTG A | 602 | Toma y col. 2009 |
| | toxB.1468R | TTC TTA CCT GAT CTG ATG CAG C | | |
| <i>efa1</i> | 88T14 | GAGACTGCCAGAGAAAG | 479 | Nicholls y col. 2000 |
| | 88T9 | GGTATTGTTGCATGTTCAAG | | |
| <i>lpfA1-1</i> | LPFA1-AF | AGTTGGTGATAAATCACCAT | 222 | Torres y col. 2009 |
| | LPFA1-AR | GTGCTGGATTCACTACTTTCATCG | | |
| <i>lpfA1-2</i> | LPFA1-B1F | AAGTCTGTATTTACTGCTATG | 273 | Torres y col. 2009 |
| | LPFA1-B1R | GAAATACAGAACGGTCTGA | | |
| <i>lpfA1-3</i> | LPFA1-CF | GGTTGGTGACAAATCCCCG | 244 | Torres y col. 2009 |
| | LPFA1-CR1 | CGTCTGGCCTTTACTCAGA | | |
| <i>lpfA1-4</i> | LPFA1-B2F | AAGTCGTGTTTACCACTACT | 273 | Torres y col. 2009 |
| | LPFA1-B2R | AAAATACAGAACAGTCTGG | | |
| <i>lpfA1-5</i> | LPFA1-CF | GGTTGGTGACAAATCCCCG | 250 | Torres y col. 2009 |
| | LPFA1-CR1 | GAGAACCGTCTGGCCTGTTT | | |
| <i>lpfA2-1</i> | LPFA2-B1F | GGTAGTCTGGCGTCGCCACAGA | 207 | Torres y col. 2009 |
| | LPFA2-B1R | AATACGAATACCAACGCCG | | |
| <i>lpfA2-2</i> | LPFA2-CF | CTACAGGCGGCTGATGGAACA | 297 | Torres y col. 2009 |
| | LPFA2-CR | GCTAATACCAGCGGCAGCATCGT | | |
| <i>lpfA2-3</i> | LPFA2-B2F | GGTAGTCTGGCGTCACCACAGC | 207 | Torres y col. 2009 |
| | LPFA2-B2R | AATACGAATACCGACACCC | | |
| <i>subAB</i> | subHCD F | TATGGCTTCCCTCATTGCC | 556 | Paton y col. 2004 |
| | subSCD R | TATAGCTGTTGCTTCTGACG | | |
| <i>cdt-V</i> | cdt-V F | TTCATTGTTGCGCTCCTG | 755 | Cergole-Novella y col. 2007 |
| | cdt-V R | TTTATAAGCTGGTATCCTG | | |
| <i>astA</i> | east11a | CCATCAACACAGTATATCCGA | 111 | Yamamoto y col. 1996 |
| | east11b | GGTCGCGAGTGACGGCTTTGT | | |

3.4.5. Identificación de subtipos de *stx*₂ por PCR-RFLP

Para la detección y diferenciación de subtipos de *stx*₂, se utilizó la metodología descrita por Tyler y col. (1991). La misma se basa en amplificación por PCR de un fragmento codificante de la subunidad B de *stx*₂, seguido de restricción enzimática (PCR-RFLP). Las PCR se realizaron en un volumen final de 50 µL conteniendo 5 µL de buffer de PCR 10X, 0,4 mM de cada dNTP, MgCl₂ 1,5 mM, 500 nM de cada cebador (Tabla 7), 1U de *Taq* polimerasa y 2 µL de templado de ADN. Como controles se incorporaron las cepas de *E. coli* LaMA40 O157:H7 (*stx*_{2a}), LaMA98 O113:H21 [*stx*_{2c(vh-b)}] y LaMA92 O157:[H7]

[*stx*_{2c(vh-a)}]. Las condiciones de amplificación fueron: 94°C 5 min, seguido de 30 ciclos a 94°C por 2 min, 55°C 2 min y 72°C 1 min. La extensión final fue a 72°C 5 min. El producto de amplificación se detectó por electroforesis en gel de agarosa al 2% en buffer TBE 1X teñido con bromuro de etidio.

Tabla 7. Secuencias nucleotídicas de los cebadores utilizados para la detección de las variantes de *stx*₂ por PCR-RFLP.

| Cebador | Secuencia de oligonucleotidos (5'-3') | Blanco(s) | Amplicón (pb) | Referencia |
|---------|---------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|-----------------------|
| VT2v-1 | CAT TCA GAG TAA AAG TGG CC | <i>stx</i> _{2c(vh-a)} , <i>stx</i> _{2c(vh-b)} , <i>stx</i> _{2b} | 385 | Tyler y col., 1991 |
| VT2v-2 | GGG TGC CTC CCG GTG AGT TC | | | |
| VT2-c | AAG AAG ATG TTT ATG GCG GT | <i>stx</i> _{2a} , <i>stx</i> _{2c(vh-a)} , <i>stx</i> _{2c(vh-b)} | 285 | Tyler y col., 1991 |
| VT2-d | CAC GAA TCA GGT TAT GCC TC | | | |

Los amplicones obtenidos por PCR con los cebadores VT2-c y VT2-d se cortaron con las enzimas de restricción *Hae*III, *Rsa*I y *Nci*I, para identificar los subtipos *stx*₂ (Tabla 7). Se prepararon tres mezclas de reacción para la digestión enzimática (una por cada enzima). El volumen final de reacción fue 20 µl, conteniendo 2 µl de *buffer* correspondiente a cada enzima, 1 µl de enzima (Thermoscientific), 10 µl de producto de amplificación y 7 µl de agua. La incubación se llevó a cabo en bloque térmico a 37°C por 3 horas. Los fragmentos de restricción obtenidos (Tabla 8) se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 2,5% en buffer TBE 1X teñido con bromuro de etidio.

Tabla 8. Tamaños de los fragmentos de restricción (pb) obtenidos para cada subtipo de *stx*₂

| Enzimas de restricción | genotipo <i>stx</i> ₂ | | |
|------------------------|----------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| | <i>stx</i> _{2a} | <i>stx</i> _{2c(vh-a)} | <i>stx</i> _{2c(vh-b)} |
| <i>Hae</i> III | 285 | 161, 124 | 161, 124 |
| <i>Rsa</i> I | 216, 69 | 136, 80, 69 | 216, 69 |
| <i>Nci</i> I | 285 | 285 | 159, 126 |

3.4.6. Identificación de subtipos *stx*_{2b} y *stx*_{2d} por PCR convencional

Los subtipos *stx*_{2b} y *stx*_{2d} se determinaron mediante el método desarrollado por Scheutz y col. (2012). Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados se indican en la tabla 9. Como controles se

incorporaron las cepas *E. coli* D2587 (*stx_{2b}*) y D3435 (*stx_{2d}*). Las concentraciones de los reactivos y el programa de PCR utilizado se describen en el anexo 1.

Tabla 9. Secuencias nucleotídicas de los cebadores específicos utilizados para la detección de las variantes *stx_{2b}* y *stx_{2d}* por PCR convencional

| Subtipo | Cebador | Secuencia de oligonucleótidos (5'-3') | Amplificación (pb) | Referencia |
|-------------------------|----------|---------------------------------------|--------------------|-----------------------|
| <i>stx_{2b}</i> | stx2b-F1 | AAATATGAAGAAGATATTTGTAGCGGC | 251 | Scheutz y col. (2012) |
| | stx2b-R1 | CAGCAAATCCTGAACCTGACG | | |
| <i>stx_{2d}</i> | stx2d-F1 | AAARTCACAGTCTTTATATACAACGGGTG | 179 | |
| | stx2d-R1 | TTYCCGGCCACTTTTACTGTG | | |
| | stx2d-R2 | GCCTGATGCACAGGACTGGAC | | |

3.4.7. Identificación de los subtipos de *stx₁* por PCR convencional

El subtipo de *stx₁* se estudió mediante el método desarrollado por Scheutz y col. (2012). Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados se indican en la tabla 10. Como controles se incorporaron las cepas de *E. coli* LaMA1304 (*stx_{1a}*), LaMA1305 (*stx_{1c}*) y LaMA1306 (*stx_{1d}*). Las concentraciones de los reactivos y el programa de PCR utilizado se describen en el anexo 1.

Tabla 10. Secuencias nucleotídicas de los cebadores específicos utilizados para la detección de las variantes de *Stx1*.

| Gen | Cebador | Secuencia de oligonucleótidos (5'-3') | Amplificación (pb) | Referencia |
|-------------------------|----------|---------------------------------------|--------------------|-----------------------|
| <i>stx_{1a}</i> | stx1a-F1 | CCTTCCAGGTACAACAGCGGTT | 478 | Scheutz y col. (2012) |
| | stx1a-R2 | GGAAACTCATCAGATGCCATTCTGG | | |
| <i>stx_{1c}</i> | stx1c-F1 | CCTTCTGGTACAACAGCGGTT | 252 | |
| | stx1c-R1 | CAAGTGTGTACGAAATCCCCTCTGA | | |
| <i>stx_{1d}</i> | stx1d-F1 | CAGTTAATGCGATTGCTAAGGAGTTTACC | 203 | |
| | stx1d-R2 | CTTCTCTGGTTCTAACCCCATGATA | | |

3.4.8. Identificación de la variante γ_1 del gen *eae*

Para la detección de *eae- γ_1* se utilizó la técnica descrita por Gannon y col. (1993). En la tabla 11 se describen los oligonucleótidos utilizados. Las concentraciones de los reactivos y el programa de PCR utilizado se describen en el anexo 1. Como control positivo y negativo se utilizó ADN templado de las cepas *E. coli* EDL933 (*eae- γ_1*) y *E. coli* ATCC 25922 respectivamente.

Tabla 11. Secuencia de oligonucleótido utilizados para identificar la variante γ del gen *eae*.

| Gen | Cebador | Secuencia de oligonucleótidos (5'-3') | Amplificación (pb) | Referencia |
|---------------------------------|---------|---------------------------------------|--------------------|---------------------|
| <i>eae-γ1</i> | EAE19 | GCGCTGTCGAGTTCTATCGAGC | 1087 | Gannon y col., 1993 |
| | EAE20 | CAACGGTGACTTTATCGCCATTCC | | |

3.4.9. Detección de los genes *aggR* y *aaiC*

Las secuencias específicas de ADN de EAEC fueron detectadas por PCR en tiempo real, utilizando sondas TaqMan (IDT, EE.UU.), según metodología recomendada por el laboratorio de referencia para *E. coli* de la Unión Europea (EU-RL VTEC, 2015). Se utilizó un termociclador en tiempo real modelo StepOne™ plus *Real-Time PCR System* (Applied Biosystems). Las concentraciones de los reactivos y el programa de PCR utilizado se describen en el anexo 1. Como control positivo y negativo se utilizó ADN templado de las cepas EAEC 17-2 (*aggR*, *aaiC*) y *E. coli* ATCC 25922 respectivamente.

3.5. Subtipificación molecular de las cepas de STEC

Para establecer la diversidad genética y la relación clonal entre las cepas de STEC O157:H7 aisladas en el presente estudio, se utilizaron las técnicas de ERIC-PCR y PFGE y se determinó el poder discriminatorio de ambas técnicas.

3.5.1. ERIC-PCR

La técnica de ERIC-PCR fue realizada según Liu y col. (1995). Para la extracción del ADN total de las cepas, los aislamientos conservados a -70°C fueron sembrados en CTS (Britania) e incubados a 37°C durante 4 horas. Luego se repicó en SMAC incubando durante 18 h a 37°C. A partir de una colonia se realizó subcultivo en CTS a 37°C durante 18h. Se centrifugó 1 ml de cultivo bacteriano durante 2 minutos a 14.000 rpm, descartando el sobrenadante. La extracción y purificación del ADN genómico se realizó con el kit *Wizard™ Genomic DNA Purification Kit* (Promega, Wisconsin, EE.UU). Se utilizaron los oligonucleótidos ERIC1R (5' ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC 3') y ERIC2 (5' AAGTAAGTGAC TGGGGTGAGCG 3') (Invitrogen) descritos por Versalovic y col. (1991). La mezcla de reacción contenía 10 μ l de *buffer* de reacción MINT 5 X (Inbio, Argentina), 4 μ l de mezcla de dNTPs 2,5 mM (Invitrogen), 3 μ l de Cl_2Mg 25 mM (Inbio), 0,5 μ l de cada oligonucleótido 100 μ M (Invitrogen), 0,2 μ l de T-plus ADN

polimerasa 5 U/μl (Inbio), 2 μl de ADN templado y 29,8 μl de agua tridestilada. La amplificación se realizó en un termociclador *My Cycler™ Thermal Cycler* (Bio-Rad, EE.UU.) con una desnaturalización inicial a 95° C durante 5 minutos, seguida de 35 ciclos (desnaturalización 94° C durante 30 s, pegado de cebadores a 40°C durante 3 min y extensión a 72°C durante 2 min) y la extensión final a 72°C durante 7 min. Los fragmentos de ADN obtenidos fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 2% (Invitrogen Life Technologies, Brasil) con bromuro de etidio (2 μg/ml) (Promega). La corrida electroforética fue realizada en *buffer* TAE 1X durante 80 min a 80 V y el marcador de peso molecular utilizado fue 1 Kb DNA *ladder* (Promega).

3.5.2. Electroforesis en gel de campo pulsado

El análisis de los fragmentos de macrorrestricción por PFGE fue realizado utilizando el protocolo PulseNet de 24 hs estandarizado para *E. coli* O157:H7 recomendado por el CDC (*Center for Diseases Control*, Atlanta, GA, EE.UU.), con mínimas modificaciones (CDC, 2013). Las cepas en estudio y la cepa control (*Samonella* Braenderup H9812) fueron incubadas a 37°C durante 18 horas en agar Mueller-Hinton. Se preparó una suspensión de las cepas en *buffer* CSB (Tris 100 mM, EDTA 100 mM, pH 8), ajustando su turbidez a 4,0 de la escala de MacFarland. Se tomaron 200 μl de cada suspensión bacteriana los que fueron mezclados con 10 μl de proteinasa K (20mg/ml) y 200 μl de agarosa (Pulsed Field Certified Agarosa, BioRad, Hercules, CA, EE.UU.) al 1% en *buffer* TE (Tris10mM: EDTA 1mM, pH 8). Esta mezcla se dispensó en moldes para preparar los bloques de agarosa (*plugs*). Para realizar la lisis celular, los *plugs* solidificados se colocaron en tubos conteniendo 5 ml de *buffer* de lisis celular (Tris 50 mM: EDTA 50mM, pH 8 + sarcosina 1%) y 25 μl de proteinasa K (20 mg/ml) e incubados en baño termostático a 54°C con agitación por 1,5 horas. Luego los bloques fueron lavados con agua ultrapura estéril (2 lavados) y *buffer* TE (4 lavados) por 10-15 minutos en agitación a 54 °C. El ADN de cada cepa contenido en los bloques de agarosa fue digerido con 30 U de la enzima de restricción *Xba*I (ThermoScientific) a 37°C por 3 horas. Los fragmentos de ADN fueron separados por electroforesis, en gel de agarosa al 1% en *buffer* Tris-Borato-EDTA 0,5X a 14 °C, en una cámara de electroforesis CHEF-DR III System (BioRad, EE.UU.). El tiempo de corrida fue de 20.5 h, con un voltaje constante de 6 V/cm, usando un pulso lineal rampeado de 2.2 a 54.2 seg y el ángulo del campo eléctrico fue de 120°. La tinción del gel se realizó con 0,75 μg/ml de solución de bromuro de etidio (Promega), las bandas fueron visualizadas y fotografiadas con transiluminación UV.

3.5.3. Análisis de los perfiles moleculares

Los perfiles moleculares obtenidos por ERIC-PCR y *Xba*I-PFGE fueron documentados utilizando el sistema de adquisición de imágenes Doc-It®LS Image Acquisition Software (Upland, CA, EE.UU.). Las imágenes en formato TIFF fueron analizadas con el *software* BioNumerics versión 6.6.4 (Applied Maths, Kortrijk, Bélgica). La relación entre los perfiles fue estimada mediante la proporción de bandas compartidas, aplicando el coeficiente de similitud de Dice y generando dendrogramas basados en el método *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean* (UPGMA). En el caso de ERIC-PCR se utilizó una optimización de 0,5%, tolerancia de posición del 1,5% y para los patrones obtenidos por *Xba*I-PFGE, la optimización fue del 0,1% y la tolerancia 1%. Las cepas fueron agrupadas en *cluster* cuando mostraron idéntico patrón *Xba*I-PFGE (100% de similitud).

3.5.4. Poder discriminatorio

Se consideraron los resultados obtenidos con las cepas que pudieron ser analizadas con ambas técnica de subtipificación (Struelens y col., 1996). El poder discriminatorio (D) de las técnicas fue determinado mediante el índice de Diversidad de Simpson (Hunter y Gaston, 1988), según la fórmula:

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \times \sum_{j=1}^s x_j(x_j-1)$$

Donde *N* es el número total de cepas estudiadas, *x_j* el número de cepas pertenecientes al tipo *j* y *s* el número de tipos diferentes. Este índice se basa en la probabilidad que dos cepas no relacionadas tomadas de una población en estudio puedan ser ubicadas en diferentes grupos.

3.6. Métodos estadísticos

Cuando se utilizó cálculo estadístico se utilizó el test exacto de Fisher. Un valor de *P* ≤ 0,05 fue considerado estadísticamente significativo.

3.7. Aspectos éticos

El presente trabajo se llevó a cabo teniendo en cuenta las recomendaciones establecidas en la Declaración de Helsinki para la investigación biomédica en seres humanos, adoptada por la 18va Asamblea Médica Mundial (Helsinki, Finlandia, 1964) y sucesivas enmiendas.

Confidencialidad de los datos: El autor declara que en el presente trabajo se mantuvo la confidencialidad de la información obtenida y no aparecen datos personales de ninguno de los pacientes.

Conflictos de interés: el autor manifiesta no poseer conflictos de interés.

RESULTADOS

En el período comprendido entre marzo de 2006 y diciembre de 2012 se analizaron, por cultivo microbiológico y tamizaje con PCR múltiple, 1051 muestras de materia fecal (una por paciente). Al realizar el tamizaje por PCR de los genes *stx*₁, *stx*₂ y *rfb*_{O157}, se detectó señal positiva para alguno de estos genes en 77 muestras: 42 correspondieron a pacientes con diagnóstico de SUH y 35 a pacientes con DS. No se detectó señal positiva en ninguno de los 213 pacientes con diarrea aguda no sanguinolenta. Entre los 42 pacientes con SUH positivos al tamizaje, el 71,5% (30/42) fueron positivos para *stx*₂ y *rfb*_{O157}, y el 28,5% restante, fueron positivos solo para *stx*₂. Entre los pacientes con DS positivos al tamizaje, el 68,6% (24/35) fueron positivos para *stx*₂ y *rfb*_{O157}, 26% (9/35) para *stx*₂, una muestra positiva para *stx*₁ y *stx*₂, y una muestra positiva para *stx*₁, *stx*₂ y *rfb*_{O157}. A partir de las muestras positivas al tamizaje, se logró la recuperación de 77 cepas confirmadas como *E. coli* por pruebas bioquímicas. La tabla 12 muestra la detección de STEC según presentación clínica en el período analizado.

Tabla 12. Presentación clínica de los pacientes estudiados y aislamiento de STEC.

| Año | Diarrea sanguinolenta | | Diarrea no sanguinolenta | | Síndrome urémico hemolítico | |
|-----------|-----------------------|------------|--------------------------|------------|-----------------------------|------------|
| | N° de muestras | N° de STEC | N° de muestras | N° de STEC | N° de muestras | N° de STEC |
| 2006 | 58 | 9 | 12 | 0 | 16 | 6 |
| 2007 | 74 | 4 | 7 | 0 | 18 | 7 |
| 2008 | 143 | 3 | 27 | 0 | 14 | 7 |
| 2009 | 142 | 8 | 35 | 0 | 22 | 8 |
| 2010 | 131 | 4 | 31 | 0 | 11 | 4 |
| 2011 | 95 | 4 | 35 | 0 | 10 | 2 |
| 2012 | 88 | 3 | 66 | 0 | 16 | 8 |
| Total (%) | 731 | 35 (4,8) | 213 | 0 | 107 | 42 (39,2) |

De las 77 cepas STEC aisladas, 55 (71,4%) fueron serogrupo O157 y 22 (28,6%) serogrupo no-O157.

No se detectó en ningún paciente la presencia de co-infecciones de STEC con algún otro enteropatógeno investigado (datos no mostrados).

DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIÓN EN LA CUAL SE DETECTÓ STEC

Al analizar las edades de los pacientes al momento en que se aisló STEC, la media de edad de los pacientes fue de 36 meses (rango, 6-152). El grupo etario más afectado fue el de niños menores de 5 años (75,3%) y la edad media de niños dentro de ese grupo fue de 23,5 meses. El grupo de 5 a 9 años representó el 16,9% y 2,6% fueron mayores a 10 años. En 4 pacientes (5,2%) no se tenía el dato de edad (Figura 4).

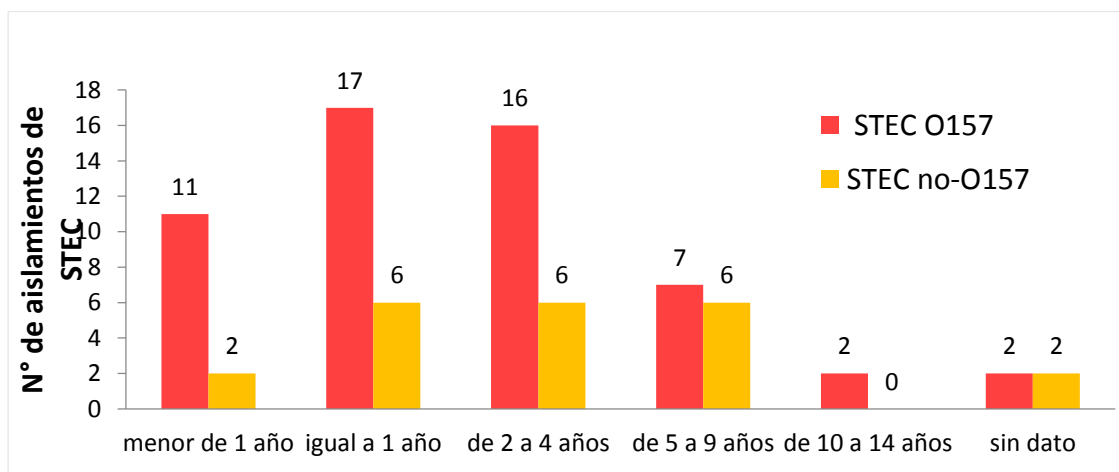


Figura 4. Distribución de casos con aislamiento de STEC por edad. Periodo 2006-2012.

Cuando se analizó la distribución de edades según diagnóstico, la edad media del grupo con SHU fue de 29,1 meses (rango, 6-142 meses) y del grupo con DS fue 45,3 meses (rango, 7-152 meses) (diferencias no significativas). El 62% de los pacientes con SHU tenían menos de 2 años y la mayor incidencia de SHU se observó en los niños de 1 año (Figura 5).

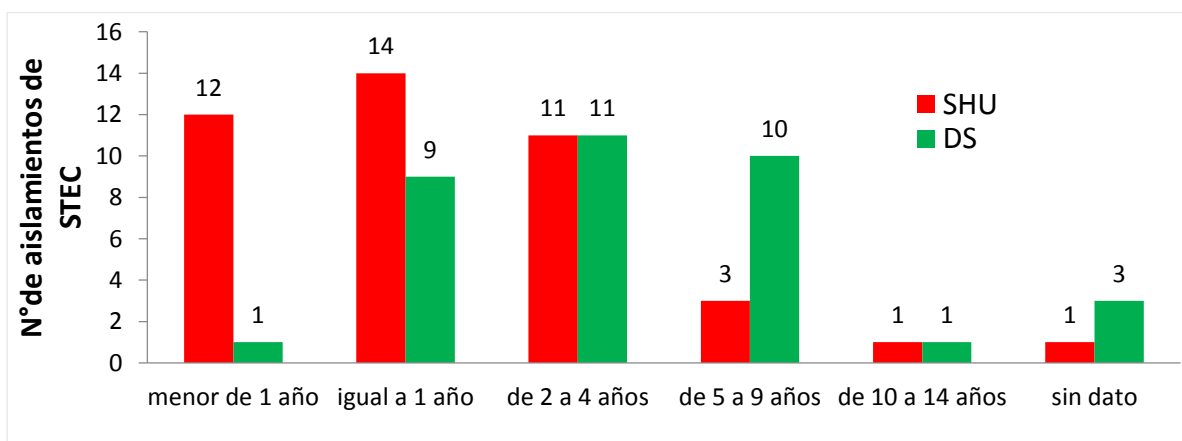


Figura 5. Distribución de casos con aislamiento de STEC según diagnóstico y edad. Periodo 2006-2012.

Del total de casos diagnosticados, 43 de ellos (56%) fueron femeninos.

Los casos de infección por STEC se presentaron durante todos los meses del año, con una incidencia estacional mayor en los meses cálidos. El número de casos entre los meses de octubre y marzo (n=54) fue superior al número registrado entre abril y septiembre (n=23). En la figura 6 se representa la distribución anual de casos (DS + SUH) de acuerdo con la semana epidemiológica en que fue realizado el diagnóstico. No se observan diferencias en la distribución estacional entre STEC O157 y no-O157.

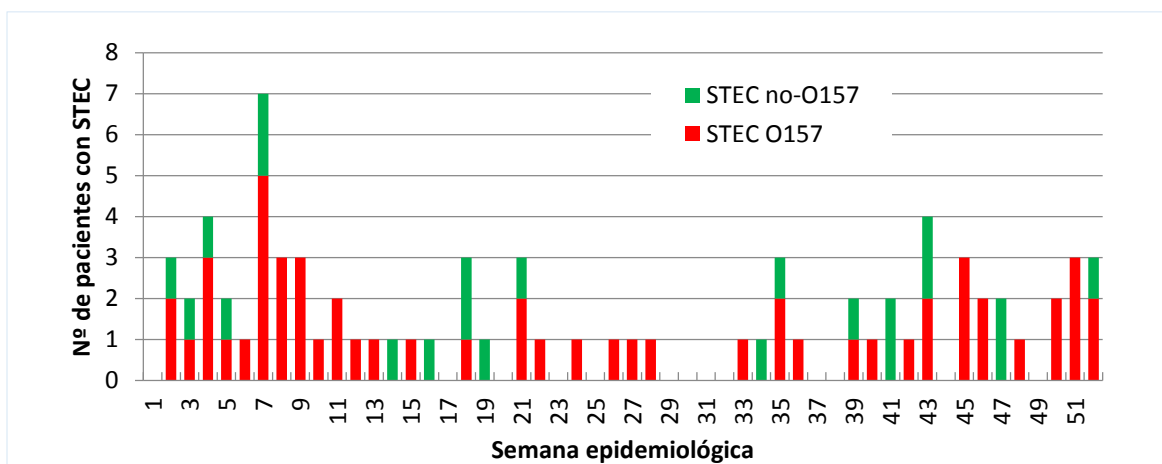


Figura 6. Distribución por semana epidemiológica de los casos con aislamiento de STEC. 2006-2012

El 42% de los pacientes donde se aisló STEC, tuvieron domicilio en la ciudad de La Plata; 37 pacientes (58%) tenían domicilio en 24 localidades/ciudades distintas: Arturo Seguí (1 paciente), Almirante Brown (1), Avellaneda (1), Azul (2), Berazategui (2), Berisso (8), Bolívar (1), Brandsen (2), Carlos Casares (1), Ensenada (1), Florencio Varela (2), Gral. Lamadrid (2), Gral. Villegas (1), Grand Bourg (1), Hurlingham (1), Las Flores (1), Lobos (1), Lomas de Zamora (1), Olavarría (1), Pilar (1), Quilmes (2), Trenque Lauquen (2); no se documentó el domicilio de 8 pacientes con DS.

CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LOS AISLAMIENTOS

Todos los aislamientos positivos al tamizaje por PCR fueron tipificados como *Escherichia coli*. La totalidad de los aislamientos fueron lactosa positiva en agar MacConkey. En agar TSI, todos los aislamientos fueron fermentadores de azúcares y generadoras de gas, sin producción de ácido sulfhídrico. En el medio MIO, todas las cepas fueron móviles a las 24 h, el 98% de los aislamientos fueron productoras de indol y el 85% decarboxiló la ornitina. Ningún aislamiento pudo utilizar el

citrato de sodio como única fuente de carbono y todos fueron ureasa negativa. Ningún aislamiento dio positivo a la prueba de citocromo oxidasa ni fenilalaninadeaminasa. Todos los aislamientos pudieron fermentar la sacarosa y ninguno la celobiosa. Ningún aislamiento fue productor de pigmento amarillo. Todas las cepas STEC del serogrupo O157 fueron β -D-glucuronidasa negativa y no pudieron fermentar el sorbitol y las 22 restantes, fueron β -D-glucuronidasa positiva y fermentaron el sorbitol.

La identificación bioquímica fue confirmada utilizando el sistema Vitek2 Compact. Los 55 aislamientos β -D-glucuronidasa negativa fueron identificados como *E. coli* O157, los 22 restantes como *E. coli*.

El 98,2% (54/55) de las cepas O157:H7 pertenecieron al biotipo C y un aislamiento perteneció al biotipo D.

Diversidad serológica de los aislamientos de STEC

Se pudieron serotipificar completamente 76 de las 77 cepas STEC aisladas (98,7%). Las mismas pertenecieron a 8 serogrupos (O26, O59, O102, O103, O121, O145, O157 y O174) y 5 tipos H distintos (H6, H7, H11, H19 y H21). Una cepa fue O no tipable (Ont) y 15 cepas (19,5%) fueron no móviles (NM). El 71,4% (n=55) de las cepas STEC aisladas en el estudio fueron O157:H7 y el 28,6% (n=22) fueron no-O157. Dentro del grupo no-O157, 12 (54,5%) correspondieron al serotipo O145:NM, 3 (13,6%) al serotipo O121:H19 y un aislamiento de cada uno de los siguientes serotipos: O26:H11, O59:H19, O102:H6, O103:NM, O174:NM y O174:H21 (Tabla13).

Tabla 13. Frecuencia de serotipos hallados según diagnóstico

| Serotipo | Diagnóstico clínico | | Total N° (%) |
|-----------|------------------------------------------|------------------------------------------------|-----------------|
| | Diarrea sanguinolenta N° (%) de cepas | Síndrome urémico hemolítico N° (%) de cepas | |
| O157:H7 | 25 (69,4) | 30 (73,2) | 55 (71,4) |
| O145:NM | 6 (16,7) | 6 (14,6) | 12 (15,6) |
| O121:H19 | - | 3 (7,3) | 3 (3,9) |
| O26:H11 | 1 | - | 1 (1,3) |
| O102:H6 | 1 | - | 1 (1,3) |
| O103:NM | 1 | - | 1 (1,3) |
| O174:NM | - | 1 | 1 (1,3) |
| O174:H21 | - | 1 | 1 (1,3) |
| O59:H19 | 1 | - | 1 (1,3) |
| Ont:NM | - | 1 | 1 (1,3) |
| Total (%) | 35 (45) | 42 (55) | 77 (100) |

NM: no móvil; Ont: antígeno O no tipable.

Sensibilidad antimicrobiana

El 96% de las cepas fueron sensibles a todos los antibióticos ensayados. Sólo tres aislamientos fueron resistentes a un sólo antibiótico: un aislamiento O157:H7 resistente a la ampicilina, un aislamiento de O145:NM resistente a tetraciclina y el aislamiento Ont:NM resistente a TMS.

Expresión de toxina Shiga

El 98,7% (76/77) de los aislamientos de STEC fueron productores de toxina Shiga detectables por ELISA. Cuando se realizó la prueba de ELISA para el aislamiento de *E. coli* O102:H6, no se detectó la producción de toxina. Al realizar la subtipificación por PCR de *stx*₂, se determinó que pertenecía al subtipo 2b (ver más adelante).

Determinación del fenotipo hemolítico

La actividad hemolítica compatible con la presencia de EHEC-Hly fue detectada en 73 (94,8%) de las 77 cepas caracterizadas. No se detectó el fenotipo enterohemolítico en 4 aislamientos no-O157: O59:H19, O145:NM, O174:NM y O174:H21. El fenotipo α -hemolítico no fue detectado en ninguna de las cepas estudiadas.

CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA DE LOS AISLAMIENTOS

Los resultados de la PCR múltiple para la identificación de las secuencias de los genes *wzx* específicas para los serogrupos de *E. coli* O26, O103, O121, O145 y O157 mostraron un 100% de correlación con los resultados obtenidos por serología para los serogrupos citados.

Todos los aislamientos de *E. coli* O157:H7 portaron el gen *fli*_{C_{H7}}.

La presencia de los genes *stx*₁, *stx*₂, *ehxA*, las 7 adhesinas putativas estudiadas y las toxinas distintas a Stx según serotipo y patología asociada se muestra en la tabla 14.

El 95% (73/77) de las cepas fueron *eae*-positivas. Todos los aislamientos de *E. coli* O157:H7 portaron la variante γ ₁ del gen *eae*.

Entre los 22 aislamientos no-O157, el 81,8% (18/22) fueron *eae*-positivos. Los 12 aislamientos de O145:NM presentaron la variante γ ₁ del gen *eae*. En los 6 aislamientos restantes *eae*-positivos, el subtipo de intimina no fue determinado.

Los 4 aislamientos *eae*-negativos pertenecieron a los serotipos O59:H19, O102:H6, O174:NM y O174:H21. En estas 4 cepas fue testeada la presencia de los genes *aggR* y *aaiC*, siendo las cepas O59:H19 y O174:H21 positivas para el gen *aggR*.

El gen *ehxA* se detectó en el 100% de las cepas O157:H7 y en el 81,8% (18/22) de las cepas no-O157. Los 4 aislamientos *ehxA*-negativos fueron de los serotipos O59:H19, O145:NM, O174:NM y O174:H21. El aislamiento O145:NM *ehxA*-negativo también fue negativo para *toxB*. Tanto el gen *ehxA* como *toxB* están codificados en el megaplásmido de virulencia y es probable que el mismo se haya perdido durante el almacenamiento.

Todos los aislamientos O157:H7 fueron positivos para *iha*, *efa1* y *toxB*. Entre los aislamientos no O157, se detectó la adhesina *iha* en el 81,8% (18/22), *efa1* en el 77,2% (17/22) y *toxB* en el 72,7% (16/22). Ninguna cepa fue negativa para los tres genes simultáneamente. Al estudiar por PCR las cepas O26:H11, O103:NM y O145:NM, todas fueron positivas para *iha*, *efa1* y *toxB* (la única excepción fue una cepa O145:NM que fue negativa para *toxB*). En cambio, en los aislamientos O121:H19, no se detectó *iha*, pero se obtuvo señal positiva para *efa1/toxB* en dos de ellos y *efa1* en uno de ellos.

Tres de los cuatro aislamientos negativos para *eae* (O102:H6, O174:NM y O174:H21) fueron positivos sólo para *iha* y no se detectó la presencia de *efa1* ni *toxB*. La cepa O59:H19, fue negativa para *eae*, *iha*, *efa1* y *toxB*.

Utilizando la clasificación experimental de las distintas variantes del gen *lpfA* propuesta por Torres y col. (2009), encontramos que todas las cepas O157:H7 portaban las variantes *lpfA1-3* y *lpfA2-2*. En cambio las cepas O145:NM portaban las variantes *lpfA1-5* y *lpfA2-3*. Entre los aislamientos distintos a O157:H7 y O145:NM, *lpfA2-1* fue la variante más prevalente (10/10; 100%), cinco de los cuales eran además *lpfA1-2* positivas. En las cepas O121:H19, O103:NM y O102:H6 no se detectó ninguna variante del gen *lpfA1*. No se aislaron cepas negativas para los genes *lpfA1* y *lpfA2* simultáneamente. No se encontraron las variantes *lpfA1-1* y *lpfA1-4* en ninguna de las cepas caracterizadas. No se pudo establecer ninguna asociación entre la presencia de alguna variante en particular de *lpfA* y la severidad de la enfermedad (SUH o DS). Lo que si se observó, que en los aislamientos O157:H7 y O145:NM se mantiene la misma combinación de variantes *lpf* independientemente de la patología asociada.

No se detectó la presencia del gen *saa* ni la presencia de secuencias relacionadas a *subAB*, *cdt-V* ni *ast1* en ninguna de las cepas estudiadas (Tabla 14).

Tabla 14. Presencia de genes *stx*₁, *stx*₂, *eae*, *ehxA*, adhesinas putativas y toxinas distintas a Stx

| Serotipo | Enfermedad asociada | N°de cepas | N° de cepas positivas | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------|---------------------|------------|-------------------------|-------------------------|-------------|------------|------------|-------------|-------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|------------|--------------|--------------|-------------|
| | | | <i>stx</i> ₁ | <i>stx</i> ₂ | <i>ehxA</i> | <i>eae</i> | <i>iha</i> | <i>efa1</i> | <i>toxB</i> | <i>lpfA1-1</i> | <i>lpfA1-2</i> | <i>lpfA1-3</i> | <i>lpfA1-4</i> | <i>lpfA1-5</i> | <i>lpfA2-1</i> | <i>lpfA2-2</i> | <i>lpfA2-3</i> | <i>saa</i> | <i>subAB</i> | <i>cdt-V</i> | <i>ast1</i> |
| O157:H7 | SUH | 30 | 0 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 0 | 0 | 30 | 0 | 0 | 0 | 30 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| O157:H7 | DS | 25 | 1 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 0 | 0 | 25 | 0 | 0 | 0 | 25 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| O145:NM | SUH | 6 | 0 | 6 | 5 | 6 | 6 | 6 | 6 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6 | 0 | 0 | 6 | 0 | 0 | 0 |
| O145:NM | DS | 6 | 0 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6 | 0 | 0 | 6 | 0 | 0 | 0 |
| O121:H19 | SUH | 3 | 0 | 3 | 3 | 3 | 0 | 3 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| O26:H11 | DS | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| O103:NM | DS | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| O59:H19 | DS | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| O102:H6 | DS | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| O174:H21 | SUH | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| O174:NM | SUH | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Ont:NM | SUH | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Total (%) | | 77(100) | 2(2,6) | 77(100) | 73(95) | 73(95) | 73(95) | 72(94) | 71(92) | 0 | 5(6,5) | 55(71,4) | 0 | 12(15,6) | 10(13) | 55(71,4) | 12(15,6) | 0 | 0 | 0 | 0 |

NM: no móvil; Ont: no tipable; *ehxA*: hemolisina de EHEC; *eae*: intimina; *iha*: Adhesina homologa a IrgA; *efa*: Factor para la adherencia de *E. coli* enterohemorrágico; *toxB*: proteína plasmídica que participa en la adherencia de STEC; *lpfA*: subunidad mayor de la fimbria polar larga; *saa*: Adhesina autoaglutinante de STEC; *subAB*: subtilasa; *cdt-V*: toxina citoletal; *ast1*: enterotoxina termoestable característica de *E. coli* enteroagregativa.

Determinación del genotipo *stx*

Todas las cepas de *E. coli* O157:H7 fueron *stx*₂ positivas y una portaba además *stx*₁. Al analizar los subtipos de las 55 cepas O157:H7, se obtuvieron los siguientes resultados: 42 (76,4%) *stx*_{2a}/*stx*_{2c(vh-a)}, nueve (16%) *stx*_{2a}, una *stx*_{2c(vh-a)} y una *stx*_{1a}/*stx*_{2a}/*stx*_{2c(vh-a)}. En el grupo de STEC no-O157, todas las cepas fueron *stx*₂ positivas y una cepa portaba además *stx*₁ (O26:H11). Al analizar los subtipos de las 22 cepas no-O157:H7, 17 (77%) fueron *stx*_{2a} positivas, dos (9%) *stx*_{2a}/*stx*_{2c(vh-a)}, una *stx*_{2d} y una *stx*_{1a}/*stx*_{2a}/*stx*_{2c(vh-a)} (Tabla 15).

Tabla 15. Genotipo *stx* de las cepas aisladas en el período de estudio (n=77)

| Serotipo | Diagnóstico clínico | N° (%) de cepas | Genotipo <i>stx</i> |
|----------|---------------------|-----------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| O157:H7 | SUH | 20 (26) | <i>stx</i> _{2a} / <i>stx</i> _{2c(vh-a)} |
| | SUH | 8 (10,4) | <i>stx</i> _{2a} |
| | SUH | 2 (2,6) | <i>stx</i> _{2c(vh-a)} |
| | DS | 22 (28,6) | <i>stx</i> _{2a} / <i>stx</i> _{2c(vh-a)} |
| | DS | 1 | <i>stx</i> _{2a} |
| | DS | 1 | <i>stx</i> _{2c(vh-a)} |
| | DS | 1 | <i>stx</i> _{1a} / <i>stx</i> _{2a} / <i>stx</i> _{2c(vh-a)} |
| O145:NM | SUH | 6 (7,8) | <i>stx</i> _{2a} |
| O145:NM | DS | 6 (7,8) | <i>stx</i> _{2a} |
| O121:H19 | SUH | 3 (3,9) | <i>stx</i> _{2a} |
| O26:H11 | DS | 1 | <i>stx</i> _{1a} / <i>stx</i> _{2a} / <i>stx</i> _{2c(vh-a)} |
| O174:NM | SUH | 1 | <i>stx</i> _{2a} |
| O174:H21 | SUH | 1 | <i>stx</i> _{2d} |
| O103:NM | DS | 1 | <i>stx</i> _{2a} / <i>stx</i> _{2c(vh-a)} |
| O102:H6 | DS | 1 | <i>stx</i> _{2b} |
| O59:H19 | DS | 1 | <i>stx</i> _{2a} |
| Ont:NM | SUH | 1 | <i>stx</i> _{2a} / <i>stx</i> _{2c(vh-a)} |

El aislamiento del serotipo O102:H6 portaba un subtipo de *stx*₂ que no pudo caracterizarse por el método de Tyler y col. El subtipo de *stx*₂ presente en este aislamiento fue identificado utilizando el método de Scheutz y col. (2012) y fue *stx*_{2b}. Utilizando el método de Tyler y col., el aislamiento O174:H21 fue categorizado como *stx*_{2c(vh-b)}, pero utilizando el método de Scheutz y col., se identificó el subtipo *stx*_{2d}.

Perfiles genéticos identificados en las cepas O157 y no-O157

Entre las cepas O157, el genotipo más frecuente fue *stx*_{2a}/*stx*_{2c(vh-a)}/*eae/ehxA/iha/efa/toxB/lpfA1-3/lpfA2-2* detectado en el 76,4% (42/55) de las mismas (Tabla 16). Entre las cepas de STEC no-O157, el genotipo más frecuente fue *stx*_{2a}/*eae/ehxA/iha/efa/toxB/lpfA1-5/lpfA2-3*, detectado en el 50% de las mismas (Tabla 17).

Tabla 16. Perfiles genéticos identificados entre las cepas STEC O157 (n=55)

| Genotipo | N° (%) de cepas |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|
| <i>stx</i> _{2a} / <i>stx</i> _{2c(vh-a)} / <i>eae / ehxA / iha / efa / toxB / lpfA1-3 / lpfA2-2</i> | 42 (76,4) |
| <i>stx</i> _{2a} / <i>eae / ehxA / iha / efa / toxB / lpfA1-3 / lpfA2-2</i> | 9 (16,4) |
| <i>stx</i> _{2c(vh-a)} / <i>eae / ehxA / iha / efa / toxB / lpfA1-3 / lpfA2-2</i> | 3 (5,4) |
| <i>stx</i> _{1a} / <i>stx</i> _{2a} / <i>stx</i> _{2c(vh-a)} / <i>eae / ehxA / iha / efa / toxB / lpfA1-3 / lpfA2-2</i> | 1 |

Tabla 17. Perfiles genéticos identificados entre las cepas STEC no-O157 (n=22)

| Serotipo | Genotipo | N° (%) de cepas |
|----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|
| O145:NM | <i>stx</i> _{2a} / <i>eae / ehxA / iha / efa / toxB / lpfA1-5 / lpfA2-3</i> | 11 (50) |
| O145:NM | <i>stx</i> _{2a} / <i>eae / iha / efa / lpfA1-5 / lpfA2-3</i> | 1 |
| O121:H19 | <i>stx</i> _{2a} / <i>eae / ehxA / efa / toxB / lpfA2-1</i> | 2 |
| O121:H19 | <i>stx</i> _{2a} / <i>eae / ehxA / efa / lpfA2-1</i> | 1 |
| O26:H11 | <i>stx</i> _{1a} / <i>stx</i> _{2a} / <i>stx</i> _{2c(vh-a)} / <i>eae / ehxA / iha / efa / toxB / lpfA1-2 / lpfA2-1</i> | 1 |
| O102:H6 | <i>stx</i> _{2b} / <i>ehxA / lpfA2-1</i> | 1 |
| O103:NM | <i>stx</i> _{2a} / <i>stx</i> _{2c(vh-a)} / <i>eae / ehxA / iha / efa / toxB / lpfA2-1</i> | 1 |
| O174:NM | <i>stx</i> _{2a} / <i>iha / lpfA1-2 / lpfA2-1</i> | 1 |
| O174:H21 | <i>stx</i> _{2d} / <i>iha / lpfA1-2 / lpfA2-1 / aggR</i> | 1 |
| O59:H19 | <i>stx</i> _{2a} / <i>lpfA1-2 / lpfA2-1 / aggR</i> | 1 |
| Ont:NM | <i>stx</i> _{2a} / <i>stx</i> _{2c(vh-a)} / <i>eae / ehxA / iha / toxB / lpfA1-2 / lpfA2-1</i> | 1 |

SUBTIPIFICACIÓN MOLECULAR

ERIC-PCR

Sobre un total de 51 cepas de *E. coli* O157:H7 analizadas, se establecieron 6 patrones ERIC-PCR con al menos 84% de similitud entre ellos. Los patrones presentaron entre 7 y 8 bandas en un rango comprendido entre 200 y 1300 pb y fueron agrupados en 6 *clusters* (I-VI). El grado de semejanza entre las cepas se representó en un dendograma de homología (Figura 7).

*Xba*I-PFGE

Al analizar los productos de restricción obtenidos al digerir con *Xba*I el genoma de las 51 cepas estudiadas de *E. coli* O157:H7, se generaron 42 patrones de bandas diferentes, con al menos 88% de similitud entre ellas. Los patrones presentaron entre 16 y 22 bandas, con tamaños aproximados de 40 a 600 kpb. El grado de semejanza entre las cepas se representó en un dendograma de homología utilizando el algoritmo UPGMA (Figura 8).

De los 42 patrones de bandas obtenidos por *Xba*I-PFGE, 36 resultaron ser patrones únicos y 15 cepas fueron agrupadas en 6 *clusters* (*cluster* definido como grupo de cepas que presentan patrón indistinguible de *Xba*I-PFGE). Los *clusters* se nombraron como #I (3 cepas: SML72, 73 y 74), #II (3 cepas: SML8, 9, y 10), #III (SML39, 40 y 77), #IV (SML22 y 26), #V (SML6 y 19) y #VI (SML32 y 43). La distribución de patrones según serotipo, factores de virulencia, diagnóstico, localidad y año de aislamiento se presenta en la Figura 8.

Las 3 cepas O157:H7 genotipo *stx*_{2a} / *stx*_{2c(vh-a)} agrupadas en el *cluster* #I, fueron aisladas en el mes de diciembre de 2011 en la ciudad de la Plata a partir de 3 pacientes con domicilio cercano (4 cuadras de distancia) en un intervalo de aproximadamente 60 días. Los 3 pacientes tuvieron DS y no requirieron internación. Aunque no fue posible establecer la fuente de infección en ninguno de los casos, la información epidemiológica disponible apunta al consumo de cremas heladas compradas en el mismo local comercial.

Las cepas O157:H7 *stx*_{2a} agrupadas en el *cluster* #II fueron aisladas de 3 casos de SUH. Las cepas fueron aisladas en el mes de enero de 2007, en un período de 15 días y en dos ciudades distintas (La Plata y Olavarría, distantes a 330 Km). De los registros de la vigilancia por UC se pudo establecer que

los residentes en la ciudad de la Plata vivían en diferentes barrios, pero los datos epidemiológicos fueron insuficientes como para establecer un nexo entre los casos.

Dos de las cepas agrupadas dentro de los *cluster* #III portan *stx*_{2a} / *stx*_{2c(vh-a)} y una sólo *stx*_{2a}. Las cepas agrupadas en el *cluster* #V poseen distinto genotipo *stx* (una *stx*_{2a} / *stx*_{2c(vh-a)} y otra *stx*_{2c(vh-a)}).

Las cepas del *cluster* #IV (2 cepas) poseían idéntico genotipo *stx* (*stx*_{2a} / *stx*_{2c(vh-a)}) y fueron recuperadas de pacientes que desarrollaron SUH, uno con domicilio en Brandsen y otro en Azul, pero los datos epidemiológicos disponibles no permitieron establecer un nexo entre los mismos.

Las cepas agrupadas en el *cluster* #VI, poseían idéntico genotipo *stx* (*stx*_{2a} / *stx*_{2c(vh-a)}) y fueron aisladas en La Plata de un caso de diarrea con sangre y de otro caso con SUH, con 5 años de diferencia entre ellos.

Poder discriminatorio de las pruebas de subtipificación genotípicas

El poder discriminatorio de ERIC-PCR para STEC O157:H7 fue de 0,69 y para *Xba*I-PFGE fue de 0,98.

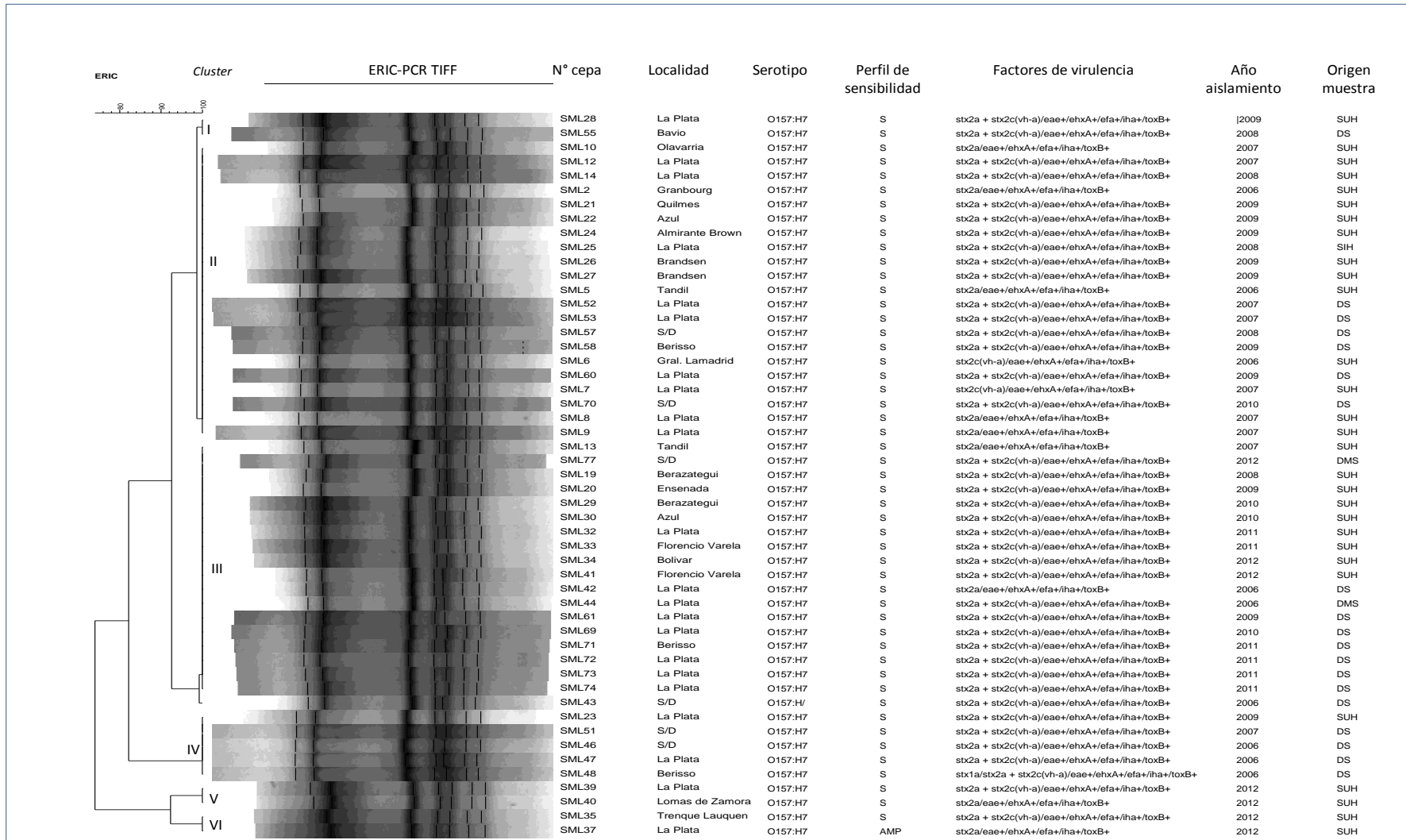


Figura 7. Dendrograma de la relación genética entre 51 cepas de *E. coli* O157:H7 estudiadas por ERIC-PCR, indicando n° de cepa, lugar de aislamiento, serotipo, perfil de sensibilidad, factores de virulencia, año de aislamiento y origen de la muestra.

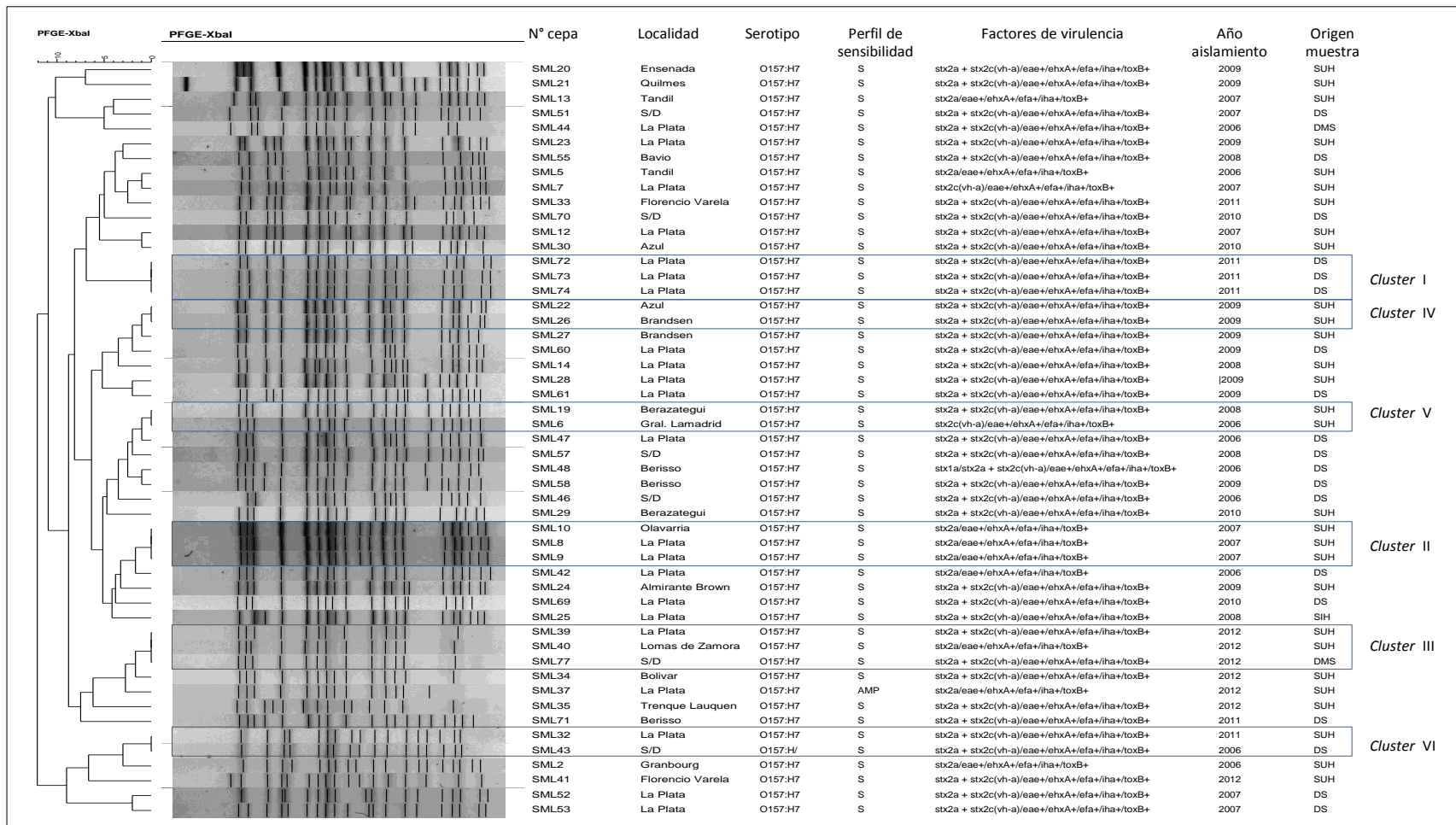


Figura 8. Dendrograma de la relación genética entre 51 cepas de *E. coli* O157:H7 estudiadas por *Xba*I-PFGE, indicando n° de cepa, lugar de aislamiento, serotipo, perfil de sensibilidad, factores de virulencia, año de aislamiento y origen de la muestra.

DISCUSIÓN

Teniendo en cuenta el número de casos de SUH que se producen anualmente y la severidad de la enfermedad, el Ministerio de Salud de la Nación estableció en el año 2000 la notificación obligatoria de esta enfermedad al Sistema Nacional de Vigilancia de la Salud (S.N.V.S.). En el año 2004, se propone la implementación de un Sistema de Vigilancia desde el Laboratorio (Módulo SIVILA), que consiste en notificar esta enfermedad a través de distintas vías: cuando ingresa un paciente con diarrea sanguinolenta, cuando se detecta el agente etiológico en un alimento o cuando se logra vincular el caso clínico con un alimento, o directamente cuando el paciente desarrolla SUH. Con el objeto de fortalecer la notificación, el seguimiento de los casos y facilitar el control y prevención de esta enfermedad, a partir del año 2005 se puso en marcha el seguimiento de ésta enfermedad a través de la vigilancia por la modalidad de Unidades Centinelas (UCSUH). Esta modalidad de vigilancia, presenta múltiples ventajas, ya que permite determinar tendencias, focalizar actividades de vigilancia y sugerir intervenciones preventivas, pero, presenta la limitación de no permitir comparar la magnitud del problema estudiado con otras sub-poblaciones o áreas donde la información no se recolecta con esta estrategia. Esto es debido a que las UCSUH seleccionan una unidad de salud sin población definida en lugar de seleccionar un área geográfica con una población definida. Este sistema de vigilancia está integrado por tres componentes: epidemiológico, clínico y de laboratorio. En el presente estudio se refleja parte del trabajo realizado en una de las 25 UCSUH que componen la Red de laboratorios para la vigilancia de SUH de Argentina.

Al ser un laboratorio integrante de la Red Nacional de Diarrea y Patógenos Bacterianos de Transmisión Alimentaria y UCSUH, a partir del año 2006 se comenzó la búsqueda de STEC utilizando tamizaje por PCR múltiple para la detección de los genes *stx*₁, *stx*₂ y *rfb*_{O157} complementando las técnicas microbiológicas estándar. En el período 2006-2012, el Hospital “Sor María Ludovica” de la Plata, notificó 187 casos de SUH al S.N.V.S. Estos datos revelan la importancia crucial que tiene la vigilancia de las diarreas y la implementación de técnicas sensibles para la detección de STEC O157 y no-O157, a fin de detectar oportunamente los casos, realizar el estudio de los contactos, sintomáticos y/o asintomáticos, y convivientes de casos de SUH, con el objetivo de vigilar la circulación y evitar la diseminación de STEC en la comunidad.

En este trabajo, *Escherichia coli* productor de toxina Shiga fue detectado en el 4,8% de los pacientes con DS y no fueron detectados en pacientes con diarrea aguda no sanguinolenta. La combinación de

procedimientos bacteriológicos y tamizaje por PCR múltiple, ha permitido mejorar sustancialmente el diagnóstico de STEC en nuestro Hospital, lo que ha significado un avance importantísimo en la calidad y oportunidad diagnóstica. En un estudio previo realizado en nuestro laboratorio, estudiando 7075 pacientes con diarrea y utilizando agar SMAC para la recuperación de STEC sin tamizaje por PCR múltiple, sólo se recuperaron 5 aislamientos de STEC O157:H7 a lo largo de 3 años de estudio (Giugno y col., 2010).

Estudios realizados en países poco desarrollados muestran una recuperación de STEC menor al 2% en niños pequeños con gastroenteritis (Cheng y col., 2005) y en EE.UU., STEC es detectado entre el 0-4,1% de las muestras enviadas a los laboratorios (Gould y col., 2009). En Argentina, Rivero y col. (2010) detectaron la presencia de STEC en el 10,1% (44/437) de las muestras analizadas de niños con diarrea aguda oriundos de las ciudades de Tandil, Bahía Blanca, Morón y Río Cuarto. A diferencia de nuestro trabajo, estos autores detectaron STEC en pacientes que presentaban diarrea no sanguinolenta (27,3% del total de positivos). López y col. (2012), estudiando prospectivamente 2435 niños (edades 0,5-15 años) con diarrea acuosa y/o sanguinolenta, detectaron la presencia de STEC en 4,1% de los pacientes que presentaron diarrea acuosa de menos de 5 días de evolución, DS de menos de 36 horas de duración o ambas, pero la incidencia de infección por STEC fue significativamente mayor en sujetos con diarrea sanguinolenta.

En este trabajo, al estudiar los pacientes que desarrollaron SUH post-entérico, pudimos evidenciar la presencia de STEC en el 39,2% de los pacientes analizados. Estos resultados son similares a los hallados por otros autores en nuestro país (32,8%, López y col., 1998; 32,8%, Rivas y col., 2006 a; 45,7%, Rivero y col., 2010) o en Chile (38,6%, Prado y col., 2008), pero inferiores a los obtenidos en Francia (66%, Espié y col., 2008) y Austria-Alemania (75%, Gerber y col., 2002). Estas diferencias en las tasas de recuperación de STEC pueden depender de diversos factores, entre ellos, el tiempo transcurrido entre el inicio de los síntomas y la recolección de la muestra, la metodología utilizada, el uso de técnicas de enriquecimiento, uso de antibióticos, etc. Por ejemplo, Tarr y col. (1990), estudiando prospectivamente pacientes que desarrollaron SUH post entérico, recuperaron *E. coli* O157:H7 en el 91,4% de las muestras cuando las mismas fueron obtenidas entre 3-6 días del inicio de la diarrea, pero la recuperación bajaba al 33% si se demoraban más de 7 días en recolectarlas, es decir, al momento que se manifestó el SUH, el 67% de los pacientes no tenían STEC O157 en MF. En el

presente estudio, la demora promedio de las muestras de materia fecal para diagnóstico microbiológico fue de 7 días (rango: 1-15) desde el comienzo de la diarrea y la instauración del SUH. Otro factor importante que afecta la recuperación de estos patógenos es la implementación de tratamiento antibiótico en los niños durante la etapa diarreica. Si bien el uso de antimicrobianos en las infecciones por STEC es muy controversial y su indicación ha sido contraindicada por diversos autores (Tarr y col., 2005; Wong y col., 2012), estudios previos realizados en nuestro Hospital (Giugno y col., 2007) y en otras regiones del país (Rivero y col., 2010), dan cuenta que entre el 16 y el 51,8% de los casos de SUH han recibido terapia antibiótica (periodo 1999-2010) Este conocimiento demuestra el manejo deficiente en la atención primaria de los casos de diarrea, especialmente la diarrea aguda sanguinolenta en función de la prevención del SUH.

Otro factor importante es la metodología utilizada para asociar al SUH con la infección por STEC. La búsqueda de toxina libre en materia fecal, anticuerpos neutralizantes anti-toxina Shiga o anti-LPS O157 en suero, utilización de separación inmunomagnética como técnica de inmuno-concentración de STEC, permite aumentar sustancialmente la evidencia de infección (Karch y col., 1996; Gerber y col., 2002; Rivas y col., 2006 a). Por ejemplo, Gerber y col. (2002), utilizando estas metodologías, pudieron evidenciar la infección por STEC en el 83% de los casos de SUH estudiados.

Cuando se analizó la edad media de los pacientes con SUH, la media del grupo fue de 29,1 m (rango, 6-142 meses), el 62% era menor de 2 años y la mayor incidencia se observa en los niños de 1 año. Estos hallazgos son un reflejo de la situación observada en nuestro país (Antman y col., 2014).

En cambio, la edad promedio del grupo de pacientes con DS fue 45,3 m (rango, 7-152 meses). A pesar de no encontrar diferencias significativas entre ambos grupos ($P>0,05$), diversos autores han reportado que los pacientes menores expuestos a STEC presentan más riesgo de evolucionar a enfermedad grave (Goldwater, 2007). Este fenómeno podría responder a un problema de competencia bacteriana y de inmunidad cruzada, ya que los niños mayores o que proceden de ambientes con condiciones sanitarias deficientes, padecen, o han padecido, otras infecciones intestinales por microorganismos que podrían impedir o limitar el desarrollo de STEC.

No se encontraron diferencias significativas entre la incidencia de SUH en niños y niñas, lo que concuerda con otros estudios realizados (Rivas y col., 2006 a; Giugno y col., 2007).

Las infecciones por STEC, se presentan a lo largo del año, con aumento de los casos en los meses cálidos. Esta distribución estacional es similar a lo publicado en Argentina (Ibarra y col., 2008; Rivero y col., 2012) y en otros países (Niskanen y col., 2015). La misma, se ha relacionado a una mayor exposición a STEC, pues el principal reservorio (rumiantes) aumenta la eliminación fecal de STEC (O157 y no-O157) en los meses cálidos, disminuyendo a niveles bajos o indetectables en invierno (Edrington y col., 2006; Rivero y col., 2012). Sin embargo, Tanaro y col. (2010), demostraron que en los meses fríos aumentó la portación de STEC O157 y no-O157 en bovinos en engorde, por lo tanto, no se puede afirmar la asociación entre la portación en el reservorio y el aumento de los casos clínicos en los meses cálidos, reafirmando que múltiples variables están en juego.

Caracterización fenotípica de los aislamientos de STEC

Las cepas STEC caracterizadas pertenecieron a varios serotipos (Tabla 13), la mayoría asociados con enfermedad grave en el hombre. *Escherichia coli* O157:H7 fue el principal agente etiológico de SUH post-entérico (73,2%) y el serotipo STEC prevalente entre los pacientes con DS estudiados (69,4%). En Argentina, el SUH post-entérico es endémico y más del 70 % de los casos están asociados con la infección por *E. coli* O157 (Rivas y col., 2006 a, 2006 b, 2008, 2010, 2011), al igual que en diversos países como Chile, Francia, Japón, Canadá y Estados Unidos (Prado y col., 2008; Espié y col., 2008; Griffin y col., 1991). La misma situación se observa en varios países de la Unión Europea (UE) (Niskanen y col., 2015).

La mayoría de las cepas O157:H7 caracterizadas en el presente estudio pertenecieron al biotipo C, al igual que la mayoría de las cepas circulantes en Argentina (Rivas y col., 2006 a; Zotta y col., 2009).

Con respecto a STEC no-O157, en los últimos años se han producido cambios notables en la epidemiología a nivel mundial, con un aumento en los casos de enfermedad humana cercano al 60% en algunos serotipos (Coombes y col., 2008; Gould y col., 2013; Niskanen y col., 2015). Los serogrupos implicados varían de país en país, aunque O26, O103, O111 y O145 tienden a ser los más frecuentes (Gerber y col., 2002; Elliott y col., 2004; Johnson y col., 2006; Rivas, 2012). En los países de la UE, los serotipos no-O157 más frecuentes en el período 2010-2012 fueron: O26:H11 (5,8%), O103:[H2] (5,7%), O63:H6 (2,8%), O145:NM (2,6%) y O91:NM (2,3%) (Niskanen y col., 2015). Durante este período, en Europa se produjo un incremento constante en la mayoría de los 20 serotipos más frecuentes incluyendo O26:H11 (56%) y O145:NM (72%), mientras que el número de casos debidos al

serogrupo O157 se mantuvo estable. Este incremento puede ser explicado en parte por una mejora en la detección de serotipos no-O157, sin embargo, la emergencia de un nuevo clon virulento del serogrupo O26 ha sido descripta (Bielaszewska y col., 2013).

En el año 2012, Rivas reportó que la frecuencia de STEC no-O157 en la Argentina (sobre 1245 cepas caracterizadas) fue: O145:[H27, NM, NT](13,6%), O121:H19 (2,2%), O26:[H2, 11, NT](1,4%), O174:[H8, 21, 28, NM](1,0%), O111:[NM, NT](0,8%), O103:[H2, NM, NT](0,6%), O8:[H16, 19](0,4%), O91:[H21, NM, NT](0,4%), O113:[H4, 19, 21](0,3%), ONT:[H6, 7, 11, 12, 49, NT](3,1%) y OR:[H11, NM, NT](0,6%).

En el presente estudio, se recuperaron cepas STEC no-O157 en el 28,5% de los casos y el serotipo más frecuente fue O145:NM. La importancia de este serotipo, como así también de O26:H11, O103:H2, O111:NM y O113:H21, radica en su capacidad de causar enfermedad humana severa y brotes epidémicos (Gómez y col., 2010).

En Argentina, STEC O174 se destaca dentro de las cepas STEC LEE-negativas y representa cerca del 1% de los serotipos asociados a enfermedad humana (Rivas, 2012). En el presente trabajo se aisló STEC O174 en dos pacientes que desarrollaron SUH. La importancia de este serogrupo radica en su virulencia, impacto local y la ausencia de un marco normativo que regule y reglamente el aislamiento e identificación en los alimentos de este y otros serotipos STEC no-O157. De esta forma, su diagnóstico escapa de los sistemas de control agroalimentario y genera cierta incertidumbre en los procesos de aseguramiento de inocuidad de los alimentos para el mercado interno. En la actualidad, los artículos del Código Alimentario Argentino (CAA) que incluyen *E. coli* O157:H7 entre los criterios microbiológicos se encuentran en revisión, incorporándose los serogrupos O145, O121, O26, O111 y O103, debido a que son los de mayor importancia en salud pública y además existen diferentes alternativas técnicas validadas para la detección y aislamiento de estos serogrupos (Leotta, comunicación personal). Sin embargo, debemos considerar que si bien el CAA contempla como criterio microbiológico la ausencia de *E. coli* O157:H7 en carne picada fresca, chacinados, vegetales, salazones, y alimentos listos para el consumo, este serotipo sigue siendo el más prevalente en la comunidad. Por lo tanto, no es suficiente con incorporar serogrupos al CAA sino que es necesario consolidar la verificación de los procesos de producción y comercialización de los alimentos, además de aumentar la capacidad analítica de los laboratorios de microbiología clínica a fin de identificar cepas enterohemorrágicas.

Al estudiar la sensibilidad de los aislamientos de STEC, la mayoría de las cepas fueron sensibles a todos los antibióticos ensayados. Esta observación ya fue reportada por otros autores Argentinos que informaron porcentajes de susceptibilidad superiores al 94% (Rivas y col., 2006 b; Rivero y col., 2010). A pesar del uso inadecuado de antibióticos en casos de diarrea que se observa en Argentina (Rivero y col., 2010), sumado al uso de diversos antibióticos como promotores del crecimiento en ganado o en medicina veterinaria (Schroeder y col., 2002), la presión de selección ejercida por los mismos no se ve reflejada en la pérdida de susceptibilidad de las cepas STEC de origen humano (Zhang y col., 2015).

Distinta es la situación observada en Europa, donde los aislamientos de STEC muestran grados variables de resistencia, en especial a estreptomicina, sulfametoxazol, ampicilina y tetraciclina, para los cuales más del 20% de los aislamientos son resistentes y la proporción de aislamientos multirresistentes (3 ó más familias de antimicrobianos) es cercana al 20% (Niskanen y col., 2015).

Al estudiar la expresión fenotípica de las toxinas Shiga por ELISA, se pudo comprobar la producción de las mismas en 76 de las 77 cepas estudiadas. La única excepción fue la cepa O102:H6 asociada a un caso de diarrea leve. Posteriormente se comprobó que esta cepa era portadora del gen *stx_{2b}*, el cual codifica para una toxina que no puede ser detectada por el ensayo inmunológico utilizado (Feng y col., 2011).

Al caracterizar el fenotipo hemolítico, el 95% de las cepas expresaban el fenotipo enterohemolítico. Debido a la estrecha relación entre la expresión de la hemolisina de EHEC calcio dependiente y la producción de toxinas Shiga, se considera que la detección del fenotipo enterohemolítico puede servir como un marcador epidemiológico útil para seleccionar rápidamente probables cepas STEC (Beutin y col., 2004). En contraste, la α -hemolisina, hallada frecuentemente en cepas de *E. coli* uropatogénico, ciertas ETEC y STEC de origen porcino (Kaufmann y col., 2006), no fue detectada en ninguna de las cepas STEC aisladas.

Caracterización genotípica de los aislamientos de STEC

Todas las cepas O157:H7 y el 82% de las no-O157 portaron el gen *eae*. Este gen se detecta más frecuentemente en cepas aisladas de pacientes con enfermedad severa como SUH o DS que en aquellos pacientes con enfermedad menos severa o controles sanos (Jenkins y col., 2003; Beutin y col., 2004). Sin embargo la presencia de *eae* no es esencial para la patogénesis y algunos serotipos de STEC LEE-negativos como O8:H19, O91:H21, O113:H21 y O174:H21 son capaces de provocar

enfermedad grave. Si bien en Argentina son de baja prevalencia (Rivas y col., 2012), la capacidad de provocar enfermedad grave y SUH de determinados serogrupos, en especial O174, justifica la vigilancia activa de estos patógenos.

El gen *ehxA* (y el fenotipo enterohemolítico) estuvo presente en todas las cepas *eae*-positivas. Este gen ha sido asociado con enfermedad severa en el hombre y su presencia ha sido reportada en más del 96% de las cepas *eae*-positivas (Paton y col., 1998; Beutin y col., 2004).

En estudios previos se ha mostrado que la virulencia de las cepas STEC para los humanos está relacionada con el tipo de toxina Shiga producida por la bacteria (Piérard y col., 1998; Friedrich y col., 2002). En este estudio se detectó la presencia de *stx*₂ en el 100% de las cepas O157 y sólo 1 cepa portaba conjuntamente *stx*₁ y *stx*₂. Esta situación es similar a la reportada en trabajos previos de Argentina, donde más del 95% de las cepas STEC O157:H7 aisladas de casos de DS y SUH producen *stx*₂ y la combinación *stx*₁+*stx*₂ es infrecuente (Rivas y col., 2011). En los países de la UE, el 61% de los aislamientos O157:H7 portan *stx*₂ y el 36% *stx*₁+*stx*₂ (Niskanen y col., 2015). En cambio, en Chile (Ríos y col., 1999), Australia (Elliott y col., 2004), Japón (Izumiya y col., 1997) y EE.UU. (Slutsker y col., 1997), son prevalentes las cepas O157:H7 que portan *stx*₁ + *stx*₂.

Al analizar las cepas O145:NM, todas portaban *stx*₂, hecho que ya fue reportado en Argentina (Rivas y col., 2006) y que también se observa en el 89% de las cepas Europeas (Niskanen y col., 2015).

Al estudiar los subtipos *stx*₂, la presencia simultánea de *stx*_{2a} y *stx*_{2c(vh-a)} se detectó en el 76% de los aislamientos O157:H7. Estos hallazgos son similares a los reportados previamente en Argentina, donde más del 90% de las cepas O157:H7 presentan esta combinación (Rivas y col., 2006 a; Leotta y col., 2008; D'Ástek y col., 2012). Este genotipo altamente virulento ha sido asociado con enfermedad severa en el hombre y se ha demostrado que está presente más frecuentemente en pacientes con DS y SUH que otros subtipos (Friedrich y col., 2002). Entre las cepas no-O157, los genotipos son más diversos, pero el genotipo *stx*_{2a} es el más prevalente, como ya fue reportado Rivas y col. (2006 b).

Manning y col. (2008), han demostrado que aislamientos clínicos de *E. coli* O157 pertenecientes al clado 8 (considerado hipervirulento) han aumentado su frecuencia en patología humana en los últimos años. Estas cepas, cuyo genotipo *stx* predominante es *stx*_{2a} + *stx*_{2c}, han adquirido factores que incrementan su capacidad de provocar enfermedad severa y circulan de manera casi exclusiva en la Argentina, representando más del 80% de los aislamientos clínicos humanos (Mellor y col., 2012). La

alta circulación en nuestro país de estas cepas hipervirulentas podría explicar en parte la alta incidencia de SUH en nuestro país (Pianciola y col., 2014).

El subtipo *stx*_{2d} se ha detectado previamente en cepas STEC *eae*-negativas de los serotipos O91:[H10, H21] y O174:[H21, NM] aisladas de pacientes con DS y SUH (Bielaszewska y col., 2006). En el presente estudio, este subtipo fue identificado en un aislamiento O174:H21 presente en un paciente con SUH utilizando la técnica propuesta por Scheutz y col. En relación al gen *stx*_{2b}, el cual se ha asociado principalmente a cuadros diarreicos no complicados y portadores humanos asintomáticos (Stephan y col., 2000), sólo se detectó en una cepa STEC O102:H6 aislada de un paciente cuya diarrea se autolimitó rápidamente y no requirió internación.

El brote ocurrido en Europa en mayo/julio de 2011, asociado al nuevo patotipo de EAEC productor de toxina Stx2a y del serotipo O104:H4, provocó 3141 casos de diarrea/CH, 881 casos de SUH y 50 muertes (Bielaszewska y col., 2011). Luego de ocurrido el mismo, el comité científico para peligros biológicos de la UE (*European Food Safety Authority*, 2013), propuso testear los genes *aggR* (regulador transcripcional) y *aaIC* (proteína secretada), ambos marcadores genéticos característicos de EAEC, en todas las cepas STEC *eae*-negativas. Siguiendo esa recomendación, todas las cepas *eae*-negativas analizadas en este trabajo fueron testeadas para estos genes. El hallazgo en las cepas SML49 serotipo O59:H19 y SML67 serotipo O174:H21 de secuencias relacionadas a EAEC (presencia de *aggR*) en cepas productoras de toxina Shiga, es un hecho no muy frecuente en nuestro país (Carbonari y col., 2015). Probablemente estas cepas STEC adquirieron por transferencia horizontal el plásmido de virulencia de cepas EAEC, ya que el gen *aaIC* (codificado en el cromosoma) dio negativo en ambas, descartando la posibilidad que sean EAEC que adquirieron los genes que codifican para la toxina Shiga, como la cepa O104:H4 que provocó el brote Europeo del 2011. Si bien es interesante este hallazgo, se desconoce el impacto de este híbrido en la salud pública.

Además de la producción de toxinas Shiga e intimina, se determinó la presencia de 6 genes (incluidas sus variantes alélicas) que codifican para adhesinas o probables adhesinas. Este conocimiento es muy importante para el desarrollo de vacunas que bloqueen los pasos iniciales de colonización en el reservorio o en el humano, de manera de evitar los pasos iniciales en la patogénesis y poder controlar la infección por STEC.

La frecuencia de *iha*, *efa1* y *toxB* en los aislamientos O157:H7 fue del 100% y en los aislamientos no-O157 fue del 81,8%, 77,2% y 72,7%, respectivamente. La alta prevalencia de *iha* hallada en el

presente estudio ya fue descrita por otros autores, independientemente del origen de la cepa STEC y de la presencia del gen *eae*. Toma y col. (2004), estudiando 139 aislamientos STEC de distinto origen (humano, animal y alimentario) y de los 5 serotipos, la describió como la adhesina más frecuente (91%) y Cergolle-Novella y col. (2007), detectó el gen *iha* en el 85% de las cepas *eae*-positivas y en el 90% de las cepas *eae*-negativas, sin encontrar diferencias significativas. Galli y col. (2010 a), estudiando cepas exclusivamente *eae*-negativas, describieron esta adhesina en el 89,4% de los aislamientos humanos. La prevalencia de *iha* entre serotipos implicados en enfermedad severa y en serotipos raramente asociados a enfermedad humana, indica que la presencia de *iha* no está directamente relacionada con el potencial patogénico del aislamiento (Ju y col., 2013). Sin embargo, dada su presencia en la mayoría de los aislamientos, no debemos excluir la posibilidad de complicaciones de la enfermedad atribuible a este factor de virulencia.

Las adhesinas *efa1* y *toxB* se encontraron fundamentalmente en las cepas *eae*-positivas y nunca en la STEC *eae*-negativas. Esta observación reportada anteriormente (Toma y col., 2004; Cergolle-Novella y col., 2007; Galli y col., 2010 a) refleja la estrecha asociación entre estos genes y la intimina. ToxB muestra un 47% de similitud con Efa1 y su gen codificante es considerado un homólogo plasmídico de *efa1*. Debido a que ToxB promueve la producción y secreción por el SSTIII de proteínas codificadas en LEE (como EspA, EspB y Tir), no es de sorprender su presencia en cepas *eae*-positivas y su ausencia en cepas *eae*-negativas. Toma y col. (2004) describieron la presencia de *efa1* en ausencia de *toxB* en algunas cepas *eae*-positivas (O26:H11, O103:H2, O111:NM) y propusieron que debido a la similitud entre Efa1 y ToxB, Efa1 compensaría funcionalmente la ausencia de ToxB.

La fimbria polar larga (LPF), además de facilitar la persistencia de *E. coli* patógenos en el reservorio animal, es uno de los pocos factores de adherencia de STEC asociados a la colonización del intestino humano (Jordan y col., 2004). STEC O157:H7 posee dos *loci* que codifican estructuras fimbriales, y genes homólogos a *lpfA* se encuentran en diversas cepas de *E. coli* comensales y ampliamente distribuidos entre los *E. coli* diarregénicos, incluyendo STEC *eae*-positivos y *eae*-negativos, y otros patógenos intestinales como *Salmonella* y *Shigella* spp. (Toma y col., 2006; Torres y col., 2009). Utilizando la clasificación de Torres y col. (2009), se identificaron varios polimorfismos dentro del gen *lpfA*, detectando la presencia de secuencias relacionadas a *lpfA1* y *lpfA2* en 93,5 % y 100% de las cepas estudiadas, respectivamente. El total de cepas O157:H7 portaba la combinación de genes *lpfA1-3* y *lpfA2-2* y las cepas O145:NM la combinación *lpfA1-5/lpfA2-3*, en ambos casos las cepas poseían la

variante $\gamma 1$ del gen *eae*. Estos hallazgos se corresponden con lo publicado por Torres y col. (2009), donde se vincula a combinaciones específicas de *lpfA1/2* con variantes específicas del gen *eae* en ciertos serotipos STEC, por ejemplo O26:H11 (*lpfA1-2/lpfA2-1/eae- β 1*) y O111:NM (*lpfA1-2/lpfA2-1/eae- θ 1*), además de los serotipos nombrados previamente. Cabe resaltar que la combinación *lpfA1-5/lpfA2-3* hallada en las cepas O145:NM se describe por primera vez en el presente trabajo, y es distinta de otras cepas O145 descritas previamente (Torres y col., 2009).

Nuestros resultados muestran la presencia de *lpfA2-1* en todas las cepas distintas de O157:H7 y O145:NM. Esto confirma las observaciones realizadas por otros autores (Toma y col., 2004; Cergolle-Novella y col., 2007; Galli y col., 2010 b) que detectaron esta subunidad fimbrial como la más frecuente entre las cepas STEC (con la excepción de O145:NM y O157:H7), independientemente del origen de la cepa y de la presencia de *eae*, postulando que podría tratarse de un importante factor de colonización. Comparando cepas *eae*-negativas de origen humano y bovino, Galli y col. (2010 b) reportaron que la variante más común identificada en las cepas de origen bovino fue *lpfA2-1*, en cambio en las cepas de origen humano la combinación *lpfA1-2* y *lpfA2-1* fue la más prevalente. Estos autores sugieren que la variante *lpfA2-1* podría estar más vinculada al reservorio bovino y aquellas cepas portadoras de *lpfA1-2* y *lpfA2-1* podrían tener la habilidad de colonizar el intestino humano y eventualmente causar enfermedad. Sin embargo, no pudieron encontrar una asociación estadísticamente significativa entre la presencia de una variante particular de *lpfA* y la severidad de la enfermedad.

Diversos autores (Paton y col., 2001; Cergolle-Novella y col., 2007) detectaron la presencia de la adhesina Saa exclusivamente en cepas STEC LEE negativas, incluyendo algunas cepas que han sido aisladas de pacientes con diarrea y SUH. Jenkins y col. (2003) llegaron a las mismas conclusiones, resaltando que *saa* es hallada más frecuentemente en cepas STEC de origen bovino que humano (diferencia estadísticamente significativa), postulando que podría tratarse de un importante factor de colonización en el ganado bovino. En el presente trabajo, *saa* no fue detectado en ninguna de las cepas STEC estudiadas.

Dos toxinas adicionales que causan apoptosis han sido identificadas en STEC. CDT-V, que induce el arresto irreversible del ciclo celular secundario a la ruptura del ADN, y SubAB que provoca un severo e irreversible *stress* del RE. Ambas toxinas fueron encontradas en cepas STEC, incluso simultáneamente

(Galli y col., 2010 a), y se ha propuesto que podrían participar en el desarrollo de la patogénesis (Bielaszewska y col., 2004; Paton y col., 2005).

CDT-V ha sido descrita principalmente en cepas de STEC O157:NM (fermentador del sorbitol), pero también en algunas cepas *eae*-negativas como O91:H21, O113:H21 y O174:H21 (Paton y col., 1999; Bielaszewska y col., 2004; Galli y col., 2010 a) y en un número limitado de aislamientos clínicos de STEC O157:H7 (Friedrich y col., 2006). En cambio, el operón *subAB* ha sido detectado exclusivamente en STEC *eae*-negativas, incluyendo O113:H21 y O174:H28 aisladas de pacientes con SUH (Paton y col., 2005; Irino y col., 2010; Galli y col., 2010 a). Es de destacar que ninguna de las cepas STEC caracterizadas en el presente estudio presentaba secuencias asociadas a estas nuevas toxinas. Sin embargo, su relevancia clínica no debe ignorarse, debido a la capacidad de transmisión por conjugación del plásmido que porta *subAB* y su potencial diseminación entre *E. coli* de distintos serotipos (Srimanote y col., 2002).

SUBTIPIFICACIÓN MOLECULAR

Para estudiar la diversidad genética de los aislamientos de *E. coli* O157:H7 recuperados de diferentes áreas geográficas, se aplicaron dos técnicas de subtipificación molecular, ERIC-PCR y *Xba*I-PFGE.

Analizando las cepas por ERIC-PCR, se obtuvieron 6 patrones de bandas con más de 84% de homología, lo cual se reflejó en un bajo poder discriminatorio ($D=0,69$). Según Hunter y col. (1988), el poder discriminatorio que debe presentar una técnica de subtipificación molecular debe ser al menos del 90% ($D=0,9$). Idealmente, los métodos de tipificación que se utilizan como método único deben poseer $D > 0,95$, y aquellas técnicas de tipificación menos discriminativas, pueden ser utilizadas en combinación con otras para alcanzar un $D > 0,95$ (Struelens, 1996). Dado su bajo poder discriminatorio, ERIC-PCR no mostró ser efectiva para discriminar entre las cepas O157:H7, por lo cual, no debería utilizarse como técnica única de subtipificación al estudiar cepas de este serotipo de origen humano. El bajo poder discriminatorio del método puede ser explicado por el limitado número de fragmentos de ADN generados al aplicar la PCR con los cebadores ERIC1R y ERIC2.

Leung y col. (2004) utilizaron ERIC-PCR para evaluar la relación genética entre aislados de STEC de diferentes orígenes, incluyendo aislamientos humanos, bovinos y porcinos, observaron que ERIC-PCR poseía bajo poder discriminatorio y no resultaba efectiva para discriminar los aislamientos de *E. coli* de distinto origen. Giammanco y col. (2002) estudiando 57 cepas de *E. coli* O157:H7 de diversos orígenes (humano, ambiental y animal), obtuvieron el mismo resultado independientemente del

origen, confirmando que el método no es útil para distinguir cepas O157:H7 no relacionadas epidemiológicamente.

Si bien esta técnica no fue útil para diferenciar los aislamientos O157:H7, es una técnica de subtipificación sencilla, económica y de fácil implementación, que puede utilizarse en centros hospitalarios con la capacidad de realizar PCR y ha sido utilizada satisfactoriamente para la tipificación de algunos patógenos como *Y. enterocolítica*, *Salmonella* y ETEC (Falcão y col., 2006; Moredo y col., 2015).

Las metodologías de subtipificación como la electroforesis de campo pulsado, permiten establecer la relación epidemiológica existente entre cepas aisladas de distintos orígenes, realizar una vigilancia de los clones circulantes en una región determinada, ayudan en el trazado de vías de transmisión y el rastreo de las fuentes (Tenover y col., 1995; Swaminathan y col., 2001; Gerner-Smidt y col., 2006). La implementación en el año 2003 del programa de vigilancia molecular de STEC, llamado PulseNet América Latina y el Caribe, ha permitido generar una Base de Datos Nacional de la Red Regional de Subtipificación para la Vigilancia de las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (red PulseNet), que permite comparar los genotipos de cepas semejantes hallados en diferentes regiones y reconocer la ocurrencia de brotes epidémicos.

Al realizar la subtipificación por *Xba*I-PFGE en nuestros aislamientos O157:H7, se observaron 42 patrones de bandas, lo que demuestra la alta diversidad genética de las cepas circulantes. Un total de 15 cepas pudieron ser agrupadas en 6 *clusters* y el resto de las cepas (n=36) presentaban patrones únicos de *Xba*I-PFGE.

Las cepas con patrones idénticos fueron aisladas de pacientes provenientes de diferentes localidades y en distintas semanas epidemiológicas, lo que demuestra que se encuentran altamente diseminadas en nuestro país. Esto significaría que estas cepas son capaces de sobrevivir, persistir a través del tiempo y probablemente diseminarse a través de distintos reservorios.

Uno de los principales hallazgos de este trabajo fue encontrar una relación clonal entre los aislamientos SML 72, 73 y 74, en donde, además de comprobar su similitud genética, fue posible establecer un nexo epidemiológico y estaríamos ante la presencia de un probable brote. Si bien no se pudo identificar la fuente de contagio, la información epidemiológica disponible apunta al consumo de cremas heladas compradas en el mismo local comercial en el mismo período de tiempo. Para confirmar esta hipótesis y poner en evidencia que estamos frente a cepas genéticamente

relacionadas y pertenecientes al mismo clon sería necesario realizar estudios complementarios como *BlnI*-PFGE (Rivas y col., 2010).

Al analizar las cepas SML8, 9 y 10, los tres aislamientos también tenían idéntico genotipo y patrón *XbaI*-PFGE, pero los datos disponibles fueron insuficientes como para establecer un nexo entre los mismos. Sin embargo, estos casos esporádicos pertenecientes al mismo *cluster* podrían ser parte de un brote con características de “difuso” (Gómez y col., 2010).

En Argentina, diversos brotes de SUH o enfermedad asociada a STEC han sido identificados a través del Sistema Nacional de Vigilancia. En el periodo 2002-2009, fueron reportados un total de 12 brotes de DS y SUH ocurridos en jardines de infantes, familias o en la comunidad, asociados a cepas O157 y no-O157 (Rivas y col., 2010). En el año 2008, la UCSUH de la Provincia de La Pampa, logró establecer la relación clonal entre cepas STEC O157 aisladas de un caso de SUH, un contacto (conviviente) asintomático y un alimento (Almada y col., 2009). Estos hallazgos, dan cuenta de la importancia de la aplicación de técnicas de epidemiología molecular con el objeto de mejorar la vigilancia de STEC, integrando los resultados de laboratorio con los datos epidemiológicos, pero su aplicación en tiempo real y el uso de bases de datos nacionales y regionales es fundamental para monitorear las diferencias en los perfiles de patrones detectados, a fin de identificar rápidamente la diseminación de un *cluster* y notificar a las autoridades competentes para la aplicación de acciones de control.

Dada la alta tasa de SUH en nuestro país, la falta de un tratamiento específico, y la alta morbilidad, la prevención primaria de las infecciones por STEC es fundamental para reducir el impacto sanitario de las mismas. Es importante conocer las vías de transmisión y educar en forma continua a la población, para disminuir los hábitos de riesgo, como el consumo de carne picada mal cocida, leche de vaca no pasteurizada, la inadecuada higiene de manos y de los utensilios de cocina después de manipular y cortar carne cruda durante la elaboración de los alimentos, entre otras medidas preventivas (Rivas y col.; 2008). Frente a un aislamiento de *E. coli* O157 o no-O157, se debe realizar una adecuada vigilancia epidemiológica. En niños que asisten a jardines maternos, de infantes y escuelas, se recomienda el estudio de contactos institucionales, sintomáticos y asintomáticos, y no autorizar su reingreso hasta tener 2 coprocultivos negativos con intervalos de 48 h, debido a la excreción prolongada de estos patógenos (Miliwebsky y col.; 2007).

6. CONCLUSIONES

- Este estudio de vigilancia muestra que las infecciones por STEC y el SUH constituyen un problema endémico en la ciudad de La Plata y alrededores, con casos durante todo el año.
- Se demostró que en las DS la prevalencia de STEC fue del 4,8% lo que justifica la búsqueda de STEC O157 y no-O157 en este tipo de pacientes.
- En el 39% de los pacientes con SUH fue posible evidenciar la presencia de STEC.
- La edad de presentación, sexo y distribución estacional no difieren de los datos epidemiológicos nacionales.
- *Escherichia coli* O157:H7 es el serotipo prevalente, tanto en pacientes con DS y SUH, detectado en más del 69% de los casos, seguido por O145:NM.
- La mayoría de las cepas O157:H7 pertenecieron al biotipo C y fueron sensibles a los antibióticos ensayados.
- Las cepas aisladas en este estudio, presentan serogrupos y genes de virulencia (toxinas y adhesinas) previamente descritos en cepas de STEC aisladas de casos clínicos de CH y SUH.
- Entre las cepas O157:H7 el genotipo prevalente fue *stx_{2a}/stx_{2c(vh-a)}/eae/ehxA/iha/efa/toxB/lpfA1-3/ lpfA2-2*, detectado en el 76% de los casos.
- Entre las cepas no-O157, los genotipos son más diversos pero es prevalente *stx_{2a}/eae/ehxA/iha/efa/toxB*.
- Se demostró que la técnica de subtipificación ERIC-PCR mostró un bajo poder discriminatorio y debe utilizarse en combinación con otra técnica de mayor poder discriminatorio.
- Por *Xba*I-PFGE se pudo comprobar la alta diversidad genética de las cepas de *E. coli* O157:H7 circulantes. En el estudio se detectaron 6 patrones con mayor frecuencia, y es probable que determinados clones estén ampliamente diseminados y persistan a través de los años.
- La aplicación de las técnicas de subtipificación molecular en tiempo real es fundamental para la detección y control de brotes de manera oportuna. Quedó demostrado que es posible aplicar técnicas de subtipificación molecular en una UC de SUH, aunque es necesario consolidar el exhaustivo análisis epidemiológico de los casos y fortalecer el trabajo conjunto de todos los componentes de la UCSUH.

- Es necesario redoblar los esfuerzos para la detección y aislamiento de STEC en casos de diarrea aguda. Los niños con evidencia de infección por STEC deben recibir pautas de alarma y monitorearse cuidadosamente en Centros con experiencia. El diagnóstico temprano de la infección ayuda en la toma de decisiones médicas (correcto manejo de los fluidos, uso racional de antibióticos, etc.) que pueden evitar graves consecuencias en caso de progresión a SUH. También el diagnóstico oportuno permite evitar la transmisión secundaria y prevenir probables brotes.

7. PERSPECTIVAS A FUTURO

- Adoptar las recomendaciones del CDC (Gould y col., 2009) de realizar la detección de todos los serotipos de STEC en todo tipo de diarreas comunitarias, tanto en diarreas sanguinolentas como en las acuosas, e incluso en las consideradas diarreas víricas.
- Realizar estudios complementarios a las cepas SML49 y SML67 para caracterizar genéticamente estos nuevos híbridos bacterianos.
- Se aislaron 15 cepas O157:H7 que se agruparon en 6 *clusters* por PFGE-*Xba*I. Estas cepas deben ser estudiadas utilizando una segunda enzima (*Bln*I), para confirmar la relación clonal entre las mismas.
- Establecer la diversidad genética y la relación clonal por PFGE de las cepas de *E. coli* O145:NM aisladas.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Abu-Median, A. B.; Van Diemen, P. M.; Dziva, F.; Vlisidou, I.; Wallis, T. S.; Stevens, M. P. (2006). Functional analysis of lymphostatin homologues in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. FEMS Microbiology Letters. 258: 43-49.
2. Ake, J. A.; Jelacic, S.; Ciol, M. A.; Watkins, S. L.; Murray, K. F.; Christie, D. L.; Klein, E. J.; Tarr, P. I. (2005). Relative nephroprotection during *Escherichia coli* O157:H7 infections: association with intravenous volume expansion. Pediatrics. 115: 673-680.
3. Almada, G.; Estrella, P.; Ottavianoni, L.; Pérez, S.; Rodríguez, E.; Chinen, I.; Carbonari, C.; Deza, N.; Miliwebsky, E.; Basckier, A.; Rivas, M. (2009). Relación clonal de *Escherichia coli* O157:H7 aislada en un caso de SUH, un portador asintomático y muestras de alimentos. La Pampa, Argentina, 2008. Revista Cárnica Latinoamericana. 158: 8-11.
4. Andreoli, S. P.; Trachtman, H.; Acheson, D. W.; Siegler, R. L.; Obrig, T. G. (2002). Hemolytic uremic syndrome: Epidemiology, pathophysiology, and therapy. Pediatric Nephrology. 17: 293-8.
5. Antman, J.; Geffner, L.; Pianciola, L.; Rivas, M. (2014). Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) en Argentina, 2010-2013. Extracto del Boletín Integrado de Vigilancia. N°222. Disponible en: <http://www.msal.gob.ar>.
6. Armstrong, G. L.; Hollingsworth, J.; Morris Jr, J. G. (1996). Emerging foodborne pathogens: *Escherichia coli* O157:H7 as a model of entry of a new pathogen into the food supply of the developed world. Epidemiologic Reviews. 18: 29-51.
7. Avery, L. M.; Williams, A. P.; Killham, K.; Jones, D. L. (2008). Survival of *Escherichia coli* O157: H7 in waters from lakes, rivers, puddles and animal-drinking troughs. Science of the Total Environment. 389: 378-385.
8. Bäumler, A. J.; Tsolis, R. M.; Heffron, F. (1996). The lpf fimbrial operon mediates adhesion of *Salmonella* Typhimurium to murine Peyer's patches. Proceedings of the National Academy of Sciences. 93: 279-283.

9. Bentancor, A. B.; Ameal, L. A.; Calviño, M. F.; Martinez, M. C.; Miccio, L.; Degregorio, O. J. (2011). Risk factors for Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in preadolescent schoolchildren in Buenos Aires, Argentina. *The Journal of Infection in Developing Countries*. 6: 378-386.
10. Bettelheim, K. A. (2007). The Non-O157 Shiga-Toxigenic (Verocytotoxigenic) *Escherichia coli*; Under-Rated Pathogens. *Clinical Microbiology Reviews*. 33: 67-87.
11. Bettelheim, K. A.; Goldwater, P. N. (2014). Serotypes of Non-O157 Shigatoxigenic *Escherichia coli* (STEC). *Advances in Microbiology*. 4: 377-389.
12. Beutin, L.; Montenegro, M. A.; Orskov, I.; Orskov, F.; Prada, J.; Zimmermann, S.; Stephan, R. (1989). Close association of verotoxin (Shiga-like toxin) production with enterohemolysin production in strains of *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology*. 27: 2559-2564.
13. Beutin, L.; Krause, G.; Zimmermann, S.; Kaulfuss, S.; Gleier, K. (2004). Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from human patients in Germany over a 3-year period. *Journal of Clinical Microbiology*. 42: 1099-1108.
14. Bielaszewska, M.; Fell, M.; Greune, L.; Prager, R.; Fruth, A.; Tschäpe, H.; Schmidt, M. A.; Karch, H. (2004). Characterization of cytolethal distending toxin genes and expression in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains of non-O157 serogroups. *Infection and Immunity*. 72: 1812-1816.
15. Bielaszewska, M.; Friedrich, A. W.; Aldick, T.; Schürk-Bulgrin, R.; Karch, H. (2006). Shiga toxin activatable by intestinal mucus in *Escherichia coli* isolated from humans: predictor for a severe clinical outcome. *Clinical Infectious Diseases*. 43: 1160-1167.
16. Bielaszewska, M.; Köck, R.; Friedrich, A. W.; Von Eiff, C.; Zimmerhackl, L. B.; Karch, H.; Mellmann, A. (2007). Shiga toxin-mediated hemolytic uremic syndrome: time to change the diagnostic paradigm?. *PLoS One*. 2: e1024.
17. Bielaszewska, M.; Mellmann, A.; Zhang, W.; Köck, R.; Fruth, A.; Bauwens, A.; Peters, G.; Karch, H. (2011). Characterisation of the *Escherichia coli* strain associated with an outbreak of haemolytic

- uraemic syndrome in Germany, 2011: a microbiological study. *The Lancet Infectious Diseases*. 11: 671-676.
18. Bielaszewska, M.; Mellmann, A.; Bletz, S.; Zhang, W.; Köck, R.; Kossow, A.; Prager, R.; Fruth, A.; Orth-Holler, M. M.; Morabito, S.; Caprioli, A.; Piérard, D.; Smith, G.; Jenkins, C.; Curová, K.; Karch, H. (2013). Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26: H11/H-: a new virulent clone emerges in Europe. *Clinical Infectious Diseases*. 56: 1373-1381.
19. Blanco, M.; Blanco, J. E.; Mora, A.; Blanco, J. (1996). *Escherichia coli* septicémicos aviaries: serotipos, factores de virulencia, resistencia a antibióticos y desarrollo de vacunas. Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela (LUGO). *Medicina Veterinaria*. 13(10).
20. Blanco, J. E.; Blanco, M.; Alonso, M. P.; Mora, A.; Dahbi, G.; Coira, M. A. (2004). Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from human patients: Prevalence in Lugo, Spain, from 1992 through 1999. *Journal of Clinical Microbiology*. 42: 311-9.
21. Bosilevac, J. M., Koohmaraie, M. (2011). Prevalence and characterization of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from commercial ground beef in the United States. *Applied and Environmental Microbiology*. 77: 2103-2112.
22. Brett, K. N.; Ramachandran, V.; Hornitzky, M. A.; Bettelheim, K. A.; Walker, M. J.; Djordjevic, S. P. (2003). stx1c is the most common Shiga toxin 1 subtype among Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from sheep but not among isolates from cattle. *Journal of Clinical Microbiology*. 41: 926-936.
23. Bürk, C., Dietrich, R., Açar, G., Moravek, M., Bülte, M., Märtlbauer, E. (2003). Identification and characterization of a new variant of Shiga toxin 1 in *Escherichia coli* O157:H19 of bovine origin. *Journal of Clinical Microbiology*. 41: 2106-2112.
24. Carbonari, C.; Miliwebsky, E.; Deza, N.; Zolezzi, G.; Manfredi, E.; D'Astek, B.; Baschkier, A.; Chinen, I.; Rivas, M. (2015). Novel EAEC/STEC hybrid O59:NM[H19] strains isolated from human infections

in Argentina. En: Abstracts del 9th Triennial International Symposium on Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Infections, Boston, Massachusetts.

25. Castillo, A.; Eguiarte, L. E.; Souza, V. (2005). A genomic population genetics analysis of the pathogenic enterocyte effacement island in *Escherichia coli*: the search for the unit of selection. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 102: 1542-1547.
26. Centers for Disease Control and Prevention. (2013). Standard Operating Procedure for PulseNet PFGE of *Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia coli* non-O157 (STEC), *Salmonella* serotypes, *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri*. Disponible en : <http://www.cdc.gov/pulsenet/PDF/ecoli-shigella-salmonella-pfge-protocol-508c.pdf>
27. Cergole-Novella, M. C.; Nishimura, L. S.; Dos Santos, L. F.; Irino, K.; Vaz, T. M. I.; Bergamini, A. M.; Guth, B. E. C. (2007). Distribution of virulence profiles related to new toxins and putative adhesins in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from diverse sources in Brazil. FEMS Microbiology Letters. 274: 329-334.
28. Chase-Topping, M.; Gally, D.; Low, C.; Matthews, L.; Woolhouse, M. (2008). Super-shedding and the link between human infection and livestock carriage of *Escherichia coli* O157. Nature Reviews Microbiology. 6: 904-912.
29. Cheng, A. C., McDonald, J. R., Thielman, N. M. (2005). Infectious diarrhea in developed and developing countries. Journal of Clinical Gastroenterology. 39: 757-773.
30. Chinen, I.; Epszteyn, S.; Melamed, C. L.; Aguerre, L.; Martinez Espinosa, E.; Motter, M. E.; Baschkier, A.; Manfredi, E.; Miliwebsky, E.; Rivas, M. (2009). Shiga toxin producing *Escherichia coli* O157 in beef and chicken burgers, and chicken carcasses in Buenos Aires, Argentina. International Journal of Food Microbiology. 132: 167-171.
31. Clinical and Laboratory Standards Institute (2013). M100-S23. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 23rd Informational Supplement Wayne, PA, USA.

32. Coll, P.; Coque, M. T.; Domínguez, M. A.; Vázquez, J.; Vila, J. (2005). Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica: métodos moleculares de tipificación epidemiológica en Bacteriología.
33. Coombes, B. K.; Wickham, M. E.; Mascarenhas, M.; Gruenheid, S.; Finlay, B. B.; Karmali, M. A. (2008). Molecular analysis as an aid to assess the public health risk of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains. *Applied and Environmental Microbiology*. 74: 2153-2160.
34. Croxen, M. A.; Law, R. J.; Scholz, R.; Keeney, K. M.; Wlodarska, M.; Finlay, B. B. (2013). Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*. 26: 822-880.
35. D'Astek, B. A.; del Castillo, L. L.; Miliwebsky, E.; Carbonari, C.; Palladino, P. M.; Deza, N.; Rivas, M. (2012). Subtyping of *Escherichia coli* O157: H7 strains isolated from human infections and healthy cattle in Argentina. *Foodborne Pathogens and Disease*. 9: 457-464.
36. Deacon, V.; Dziva, F.; Van Diemen, P. M.; Frankel, G.; Stevens, M. P. (2010). Efa-1/LifA mediates intestinal colonization of calves by enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O26: H—in a manner independent of glycosyltransferase and cysteine protease motifs or effects on type III secretion. *Microbiology*. 156: 2527-2536.
37. DebRoy, C.; Roberts, E.; Fratamico, P. M. (2011). Detection of O antigens in *Escherichia coli*. *Animal Health Research Reviews*. 12: 169-185.
38. Doughty, S.; Sloan, J.; Bennett-Wood, V.; Robertson, M.; Robins-Browne, R. M.; Hartland, E. L. (2002). Identification of a novel fimbrial gene cluster related to long polar fimbriae in locus of enterocyte effacement-negative strains of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*. 70: 6761-6769.
39. Edrington, T. S.; Callaway, T. R.; Ives, S. E.; Engler, M. J.; Loofer, M. L.; Anderson, R. C.; Nisbet, D, J. (2006). Seasonal shedding of *Escherichia coli* O157: H7 in ruminants: a new hypothesis. *Foodborne Pathogens and Disease*. 3: 413-421.

40. EFSA (2013). Scientific Opinion on VTEC-seropathotype and scientific criteria regarding pathogenicity assessment. *EFSA Journal*. 11: 3138.
41. Elliott, S. J.; Sperandio, V.; Girón, J. A.; Shin, S.; Mellies, J. L.; Wainwright, L.; Hutcheson, S. W.; McDaniel, T. K.; Kaper, J. B. (2000). 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*. *Infection and Immunity*. 68: 6115-6126.
42. Elliott, E. J.; Lynn, R.; Schmid, F.; Proulx, F.; Wong, W.; Sockett, P.; Adek, R. (2004). Haemolytic uraemic syndrome—an international perspective. *Portuguese Paediatric Surveillance Unit Bulletin*. 5: 14.
43. Eriksson, E.; Söderlund, R.; Boqvist, S.; Aspan, A. (2011). Genotypic characterization to identify markers associated with putative hypervirulence in Swedish *Escherichia coli* O157: H7 cattle strains. *Journal of Applied Microbiology*. 110: 323-332.
44. Espié, E.; Grimont, F.; Mariani-Kurkdjian, P.; Bouvet, P.; Haeghebaert, S.; Filliol, I.; Loirat, C.; Decludt, B.; Minh, N. N. T.; Vaillant, V.; deValk, H. (2008). Surveillance of Hemolytic Uremic Syndrome in Children Less Than 15 Years of Age, a System to Monitor O157 and Non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Infections in France, 1996–2000. *Pediatric Infectious Diseases Journal*. 27: 595–601.
45. EU Reference Laboratory for *E. coli*. (2015). Detection of *Enteroaggregative Escherichia coli* in food by Real Time PCR amplification of the *aggR* and *aaiC* genes. Disponible en: <http://www.iss.it/vtec/>
46. Ewing, W. H. (1986). *Edwards and Ewing's identification of Enterobacteriaceae*. 4th. Ed, New York: Elsevier Science Publishing Co. Inc.
47. Falcão, J. P.; Falcão, D. P.; Pitondo-Silva, A.; Malaspina, A. C.; Brocchi, M. (2006). Molecular typing and virulence markers of *Yersinia enterocolitica* strains from human, animal and food origins isolated between 1968 and 2000 in Brazil. *Journal of Medical Microbiology*. 55: 1539-1548.

48. Farfan, M. J.; Cantero, L.; Vidal, R.; Botkin, D. J.; Torres, A. G. (2011). Long polar fimbriae of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 bind to extracellular matrix proteins. *Infection and Immunity*. 79: 3744-3750.
49. Farfan, M. J.; Torres, A. G. (2012). Molecular mechanisms that mediate colonization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains. *Infection and Immunity*. 80: 903-913.
50. Feng, P. C.; Jinneman, K.; Scheutz, F.; Monday, S. R. (2011). Specificity of PCR and serological assays in the detection of *Escherichia coli* Shiga toxin subtypes. *Applied and Environmental Microbiology*. 77: 6699-6702.
51. Ferens, W. A.; Hovde, C. J. (2011). *Escherichia coli* O157: H7: animal reservoir and sources of human infection. *Foodborne Pathogens and Disease*. 8: 465-487.
52. Fernández-Brando, R. J.; Bentancor, L. V.; Mejías, M. P.; Panek, A. C.; Cabrera, G. G.; Exeni, R. A.; Palermo, M. S. (2011). Actualización en el tratamiento del síndrome urémico hemolítico endémico: Patogénesis y tratamiento de la complicación sistémica más grave de las infecciones por *Escherichia coli* productor de toxina Shiga. *Medicina (Buenos Aires)*. 71: 383-389.
53. Fitzhenry, R. J.; Pickard, D. J.; Hartland, E. L.; Reece, S.; Dougan, G.; Phillips, A. D.; Frankel, G. (2002). Intimin type influences the site of human intestinal mucosal colonisation by enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Gut*. 50: 180-185.
54. Fitzhenry, R.; Dahan, S.; Torres, A. G.; Chong, Y.; Heuschkel, R.; Murch, S. H.; Thomson, M.; Kaper, J.; Frankel, G.; Phillips, A. D. (2006). Long polar fimbriae and tissue tropism in *Escherichia coli* O157: H7. *Microbes and Infection*. 8: 1741-1749.
55. Frankel, G.; Lider, O.; Hershkoviz, R.; Mould, A. P.; Kachalsky, S. G.; Candy, D. C.; Cahalon, L.; Humphries, M. J.; Dougan, G. (1996). The cell-binding domain of intimin from enteropathogenic *Escherichia coli* binds to β 1 integrins. *Journal of Biological Chemistry*. 271: 20359-20364.
56. Friedrich, A. W.; Bielaszewska, M.; Zhang, W. L.; Pulz, M.; Kuczius, T.; Ammon, A.; Karch, H. (2002). *Escherichia coli* harboring Shiga toxin 2 gene variants: frequency and association with clinical symptoms. *Journal of Infectious Diseases*. 185: 74-84.

57. Friedrich, A. W.; Lu, S.; Bielaszewska, M.; Prager, R.; Bruns, P.; Xu, J. G.; Tschäpe, H.; Karch, H. (2006). Cytolethal distending toxin in *Escherichia coli* O157: H7: spectrum of conservation, structure, and endothelial toxicity. *Journal of Clinical Microbiology*. 44: 1844-1846.
58. Friedrich, A. W.; Zhang, W.; Bielaszewska, M.; Mellmann, A.; Köck, R.; Fruth, A.; Tschäpe H.; Karch, H. (2007). Prevalence, virulence profiles, and clinical significance of Shiga toxin–negative variants of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 infection in humans. *Clinical Infectious Diseases*. 45: 39-45.
59. Galli, L.; Miliwebsky, E.; Irino, K.; Leotta, G.; Rivas, M. (2010 a). Virulence profile comparison between LEE-negative Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains isolated from cattle and humans. *Veterinary Microbiology*. 143: 307-313.
60. Galli, L.; Torres, A. G.; Rivas, M. (2010 b). Identification of the long polar fimbriae gene variants in the locus of enterocyte effacement-negative Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from humans and cattle in Argentina. *FEMS Microbiology Letters*. 308: 123-129.
61. Gannon, V. P.; Rashed, M.; King, R. K.; Thomas, E. J. (1993). Detection and characterization of the *eae* gene of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* using polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*. 31: 1268-1274.
62. Gannon, V. P.; D'Souza, S.; Graham, T.; King, R. K.; Read, S. (1997). Use of flagella H7 gene as a target in multiplex PCR assays and improved specificity in identification of enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains. *Journal of Clinical Microbiology*. 36: 598-602.
63. García, A.; Fox, J. G.; Besser, T. E. (2010). Zoonotic enterohemorrhagic *Escherichia coli*: a One Health perspective. *Ilar Journal*. 51: 221-232.
64. Gasser, C.; Gautier, E.; Steck, A.; Siebenmann, R. E.; Oechslin, R. (1955). Hemolytic-uremic syndrome: bilateral necrosis of the renal cortex in acute acquired hemolytic anemia. *Schweizerische medizinische Wochenschrift*. 85: 905.
65. Gerber, A.; Karch, H.; Allerberger, F.; Verweyen, H. M.; Zimmerhackl, L. B. (2002). Clinical course and the role of Shiga toxin–producing *Escherichia coli* infection in the hemolytic-uremic syndrome

- in pediatric patients, 1997–2000, in Germany and Austria: a prospective study. *Journal of Infectious Diseases*. 186: 493-500.
66. Gerner-Smidt, P.; Scheutz, F. (2006). Standardized pulsed-field gel electrophoresis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: the PulseNet Europe Feasibility Study. *Foodborne Pathogens and Disease*. 3: 74-80.
67. Giammanco, G. M.; Pignato, S.; Grimont, F.; Grimont, P. A.; Caprioli, A.; Morabito, S.; Giammanco, G. (2002). Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157: H7 isolated in Italy and in France. *Journal of Clinical Microbiology*. 40: 4619-4624.
68. Gianantonio, C. A.; Vitacco, M.; Mendilaharsu, J.; Mendilaharsu, F.; Rutty, A. (1962). Acute renal failure in infancy and childhood: clinical course and treatment of 41 patients. *The Journal of pediatrics*. 61: 660-678.
69. Gianantonio, C.; Vitaco, M.; Mendilaharsu, F.; Gallo, G.; Sojo, E. (1964). Hemolytic Uremic Syndrome. *The Journal of Pediatrics*. 64: 478-91.
70. Giugno, S. M.; Bibiloni, N.; Rahman, R.; Miliwebsky, E.; Chinen, I.; Rivas, M. (2007). Asociación del síndrome urémico hemolítico con la infección por *Escherichia coli* productor de toxina Shiga. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*. 41: 27-33.
71. Giugno, S.; Oderiz, S. (2010). Etiología bacteriana de la diarrea aguda en pacientes pediátricos. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*. 44: 63-70.
72. Goldwater, P. N. (2007). Treatment and prevention of enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection and hemolytic uremic syndrome. *Expert review of anti-infective therapy*. 5: 653-663.
73. Gomez, D.; Chinen, I.; Marcelo Zotta, C.; Carbonari, C.; Lavayen, S.; Monzani, V.; Rivas, M. (2010). *Escherichia coli* O145: NM isolated from hemolytic uremic syndrome cases. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*. 44: 71-74.
74. Gould, L. H.; Bopp, C.; Strockbine, N.; Atkinson, R.; Baselski, V.; Body, B.; Carey, R.; Crandall, C.; Hurd, S.; Kaplan, R.; Neill, M.; Shea, S.; Somsel, P.; Tobin-D'Angelo, M.; Griffin, P. M.; Gerner-Smidt, P. (2009). Recommendations for diagnosis of shiga toxin--producing *Escherichia coli*

- infections by clinical laboratories. MMWR. Recommendations and reports: Morbidity and Mortality Weekly Report. Recommendations and reports/Centers for Disease Control. 58(RR-12), 1-14.
75. Gould, L. H.; Mody, R. K.; Ong, K. L.; Clogher, P.; Cronquist, A. B.; Garman, K. N.; White, P. L. (2013). Griffin for the Emerging Infections Program FoodNet Working Group, PM. Increased recognition of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in the United States during 2000–2010: Epidemiologic features and comparison with *E. coli* O157 infections. *Foodborne Pathogens and Disease*. 10: 453-460.
76. Griffin, P. M.; Tauxe, R. V. (1991). The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiologic Reviews*. 13: 60-98.
77. Griffin, P. M.; Bell, B. P.; Cieslak, P. R.; Tuttle, J.; Barrett, T. J.; Doyle, M. P.; McNamara, A. M.; Shefer, A. M.; Wells, J. G. (1994). Large outbreak of *Escherichia coli* O157: H7 infections in the western United States: the big picture. p. 7-12. En: Recent advances in verocytotoxin-producing *Escherichia coli* infections. Karmali, M. A. (ed.). Elsevier Sciences, Amsterdam.
78. Grimoldi, I. A.; Briones, L. M.; Ferraris, J. R.; Rodríguez Rilo, L.; Sojo, E.; Turconi, A.; Wainberg, E.; Zalba, J.; Sepiarsky, A. (2008). Enfermedad renal crónica, diálisis y trasplante. Estudio multicéntrico: 1996-2003. *Archivos Argentinos de Pediatría*. 106: 552-559.
79. Guerra, L.; Cortes-Bratti, X.; Guidi, R.; Frisan, T. (2011). The biology of the cytolethal distending toxins. *Toxins*. 3: 172-190.
80. Guinée, P. A. M.; Jansen, W. H.; Wadström, T.; Sellwood, R. (1981). *Escherichia coli* associated with neonatal diarrhoea in piglets and calves. In *Laboratory diagnosis in neonatal calf and pig diarrhoea* (pp. 126-162). Springer Netherlands.
81. Haugum, K.; Brandal, L. T.; Løbersli, I.; Kapperud, G.; Lindstedt, B. A. (2011). Detection of virulent *Escherichia coli* O157 strains using multiplex PCR and single base sequencing for SNP characterization. *Journal of Applied Microbiology*. 110: 1592-1600.

82. Hunter, P. R., Gaston, M. A. (1988). Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *Journal of Clinical Microbiology*. 26: 2465-2466.
83. Ibarra, C.; Goldstein, J.; Silberstein, C.; Zotta, E.; Belardo, M.; Repetto, H. A. (2008). Síndrome urémico hemolítico inducido por *Escherichia coli* enterohemorrágica. *Archivos Argentinos de Pediatría*. 106: 435-442.
84. Irino, K.; Vaz, T. M. I.; Kato, M. A. M. F.; Naves, Z. V.; Lara, R. R.; Marco, M. E. C.; Rocha, M. M. M.; Moreira, T. P.; Gomes, T. A. T.; Guth, B. E. C. (2002). O157:H7 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains associated with sporadic cases of diarrhea in São Paulo, Brazil. *Emerging Infectious Disease Journal*. 8: 446-447.
85. Irino, K.; Vieira, M. A. M.; Gomes, T. A. T.; Guth, B. E. C.; Naves, Z. V. F.; Oliveira, M. G.; Vaz, T. M. (2010). Subtilase cytotoxin-encoding *subAB* operon found exclusively among Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains. *Journal of Clinical Microbiology*. 48: 988-990.
86. Izumiya, H.; Terajima, J.; Wada, A.; Inagaki, Y.; Itoh, K. I.; Tamura, K.; Watanabe, H. (1997). Molecular typing of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 isolates in Japan by using pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of Clinical Microbiology*. 35: 1675-1680.
87. Jackson, M. P.; Neill, R. J.; O'Brien, A. D.; Holmes, R. K.; Newland, J. W. (1987). Nucleotide sequence analysis and comparison of the structural genes for Shiga-like toxin I and Shiga-like toxin II encoded by bacteriophages from *Escherichia coli* 933. *FEMS Microbiology Letters*. 44: 109-114.
88. Janka, A.; Bielaszewska, M.; Dobrindt, U.; Greune, L.; Schmidt, M. A.; Karch, H. (2003). Cytolethal distending toxin gene cluster in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H- and O157:H7: characterization and evolutionary considerations. *Infection and immunity*. 71: 3634-3638.
89. Jelacic, J. K.; Damrow, T.; Chen, G. S.; Jelacic, S.; Bielaszewska, M.; Ciol, M.; Carvalho, H. M.; Melton-Celsa, A. R.; O'Brien, A. D.; Tarr, P. I. (2003). Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Montana: bacterial genotypes and clinical profiles. *Journal of Infectious Diseases*. 188: 719-729.

90. Jenkins, C.; Willshaw, G. A.; Evans, J.; Cheasty, T.; Chart, H.; Shaw, D. J.; Dougan, G.; Frankel, G.; Smith, H. R. (2003). Subtyping of virulence genes in verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) other than serogroup O157 associated with disease in the United Kingdom. *Journal of Medical Microbiology*. 52: 941-947.
91. Johnson, W. M.; Lior, H.; Bezanson, G. S. (1983). Cytotoxic *Escherichia coli* O157: H7 associated with haemorrhagic colitis in Canada. *The Lancet*. 321: 76.
92. Johnson, K. E.; Thorpe, C. M.; Sears, C. L. (2006). The emerging clinical importance of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Clinical Infectious Diseases*. 43: 1587-95.
93. Jordan, D. M.; Cornick, N.; Torres, A. G.; Dean-Nystrom, E. A.; Kaper, J. B.; Moon, H. W. (2004). Long polar fimbriae contribute to colonization by *Escherichia coli* O157: H7 in vivo. *Infection and Immunity*. 72: 6168-6171.
94. Ju, W.; Shen, J.; Toro, M.; Zhao, S.; Meng, J. (2013). Distribution of pathogenicity islands OI-122, OI-43/48, and OI-57 and a high-pathogenicity island in Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*. 79: 3406-3412.
95. Kaper, J. B.; Nataro, J. P.; Mobley, H. L. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*. 2: 123-140.
96. Karch, H.; Janetzki-Mittmann, C.; Aleksic, S.; Datz, M. (1996). Isolation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains from patients with hemolytic-uremic syndrome by using immunomagnetic separation, DNA-based methods, and direct culture. *Journal of Clinical Microbiology*. 34: 516-519.
97. Karmali, M.; Petric, M.; Steele, B.; Lim, C. (1983). Sporadic cases of haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. *The Lancet*. 321: 619-620.
98. Karmali, M. A.; Petric, M.; Lim, C.; Fleming, P. C.; Arbus, G. S.; Lior H (1985). The association between idiopathic hemolytic uremic syndrome and infection by verotoxin-producing *Escherichia coli*. *Journal of Infectious Diseases*. 151: 775-782.

99. Karmali, M.A.; Mascarenhas, M.; Shen, S.; Ziebell, K.; Johnson, S.; Reid-Smith, R.; Isaac-Renton, J.; Clark, C.; Rahn, K.; Kaper, J. B. (2003). Association of genomic O island 122 of *Escherichia coli* EDL933 with Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* seropathotypes that are linked to epidemic and/or serious disease. *Journal of Clinical Microbiology*. 41: 4930-40.
100. Kaufmann, M.; Zweifel, C.; Blanco, M.; Blanco, J. E.; Blanco, J.; Beutin, L.; Stephan, R. (2006). *Escherichia coli* O157 and non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in fecal samples of finished pigs at slaughter in Switzerland. *Journal of Food Protection*. 69: 260-266.
101. Kimmitt, P. T.; Harwood, C. R.; Barer, M. R. (2000). Toxin gene expression by shiga toxin-producing *Escherichia coli*: the role of antibiotics and the bacterial SOS response. *Emerging Infectious Diseases*. 6: 458-465.
102. Konowalchuk, J.; Speir, J. I.; Stavric, S. (1977) Vero response to cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*. 18: 775-79.
103. Krishnan, C.; Fitzgerald, V. A.; Dakin, S. J.; Behme, R. J. (1987). Laboratory investigation of outbreak of hemorrhagic colitis caused by *Escherichia coli* O157: H7. *Journal of Clinical Microbiology*. 25: 1043-1047.
104. Leotta, G. A.; Chinen, I.; Epszteyn, S.; Miliwebsky, E.; Melamed, I. C.; Motter, M.; Ferrer, M.; Marey, E.; Rivas, M. (2005). Validación de una técnica de PCR múltiple para la detección de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga. *Revista Argentina de Microbiología*. 37: 1-10.
105. Leotta, G. A.; Miliwebsky, E. S.; Chinen, I.; Espinosa, E. M.; Azzopardi, K.; Tennant, S. M.; Robins-Browne, R. M.; Rivas, M. (2008). Characterisation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 strains isolated from humans in Argentina, Australia and New Zealand. *BMC Microbiology*. 8: 46.
106. Leung, P. H. M.; Peiris, J. S. M.; Ng, W. W. S.; Robins-Browne, R. M.; Bettelheim, K. A.; Yam, W. C. (2003). A newly discovered verotoxin variant, VT2g, produced by bovine verocytotoxigenic *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*. 69: 7549-7553.

107. Leung, K. T.; Mackereth, R.; Tien, Y. C.; Topp, E. (2004). A comparison of AFLP and ERIC-PCR analyses for discriminating *Escherichia coli* from cattle, pig and human sources. *FEMS Microbiology Ecology*. 47: 111-119.
108. Lim, J. Y.; La, H. J.; Sheng, H.; Forney, L. J.; Hovde, C. J. (2010). Influence of plasmid pO157 on *Escherichia coli* O157: H7 Sakai biofilm formation. *Applied and environmental microbiology*. 76: 963-966.
109. Lin, J.; Smith, M. P.; Chapin, K. C.; Baik, H. S.; Bennett, G. N.; Foster, J. W. (1996). Mechanisms of acid resistance in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*. 62: 3094-3100.
110. Liu, P. Y.; Lau, Y. J.; Hu, B. S.; Shyr, J. M.; Shi, Z. Y.; Tsai, W. S.; Lin, Y. H.; Tseng, C. Y. (1995). Analysis of clonal relationships among isolates of *Shigella sonnei* by different molecular typing methods. *Journal of Clinical Microbiology*. 33: 1779-1783.
111. López, E. L.; Contrini, M. M.; De Rosa, M. F. (1998). Epidemiology of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in South America, pp. 30-37. En: J. B. Kaper; A. D O'Brien (eds.) *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* strains. ASM Press, Washington D.C., USA.
112. López, E. L.; Contrini, M. M.; Glatstein, E.; González Ayala, S. E.; Santoro, R.; Ezcurra, G.; Teplitz, E.; Matsumoto, Y.; Sato, H.; Sakai, K.; Katsuura, Y.; Hoshida, S.; Morita, T.; Harning, R.; Brookman, S. (2012). An epidemiologic surveillance of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* infection in Argentinean children: risk factors and serum Shiga-like toxin 2 values. *The Pediatric Infectious Disease Journal*. 31: 20-24.
113. Louie, M.; De Azavedo, J. C.; Handelsman, M. Y.; Clark, C. G.; Ally, B.; Dytoc, M.; Brunton, J. (1993). Expression and characterization of the eaeA gene product of *Escherichia coli* serotype O157: H7. *Infection and Immunity*. 61: 4085-4092.
114. MacFaddin, J. F. (2003). Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Ed. Médica Panamericana.

115. Manning, S. D.; Motiwala, A. S.; Springman, A. C.; Qi, W.; Lacher, D. W.; Ouellette, L. M.; Mladonicky, J. M.; Somsel, P.; Rudrik, J. T.; Dietrich, S. E.; Zhang, W.; Swaminathan, B.; Alland, D.; Whittam, T. S. (2008). Variation in virulence among clades of *Escherichia coli* O157: H7 associated with disease outbreaks. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 105: 4868-4873.
116. March, S. B.; Ratnam, S. (1986). Sorbitol-MacConkey medium for detection of *Escherichia coli* O157: H7 associated with hemorrhagic colitis. *Journal of Clinical Microbiology*. 23: 869-872.
117. McGannon, C. M.; Fuller, C. A.; Weiss, A. A. (2010). Different classes of antibiotics differentially influence Shiga toxin production. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 54: 3790-3798.
118. Mead, P. S.; Griffin, P. M. (1998). *Escherichia coli* O157:H7. *Lancet*. 352: 1207-12.
119. Melton-Celsa, A. R.; Darnell, S. C.; O'Brien, A. D. (1996). Activation of Shiga-like toxins by mouse and human intestinal mucus correlates with virulence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O91: H21 isolates in orally infected, streptomycin-treated mice. *Infection and Immunity*. 64: 1569-1576.
120. Mellor, G. E.; Sim, E. M.; Barlow, R. S.; D'Astek, B. A.; Galli, L.; Chinen, I.; Rivas, M.; Gobius, K. S. (2012). Phylogenetically related Argentinean and Australian *Escherichia coli* O157 isolates are distinguished by virulence clades and alternative Shiga toxin 1 and 2 prophages. *Applied and Environmental Microbiology*. 78: 4724-4731.
121. Mercado, E. C.; Gioffré, A.; Rodriguez, S. M.; Cataldi, A.; Irino, K.; Elizondo, A. M.; Cipolla, A. L.; Romano, M. I.; Malena, R.; Méndez, M. A. (2004). Non-O157 Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* Isolated from diarrhoeic calves in Argentina. *Journal of Veterinary Medicine*. B51: 82-88.
122. Miliwebsky, E.; Deza, N.; Chinen, I.; Martinez Espinosa, E.; Gomez, D.; Pedroni, E.; Caprile, L.; Bashckier, A.; Manfredi, E.; Leotta, G.; Rivas, M. (2007). Prolonged fecal shedding of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* among children attending day-care centers in Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*. 39: 90-2.
123. Monday, S. R.; Beisaw, A.; Feng, P. C. H. (2007). Identification of Shiga toxigenic *Escherichia coli* seropathotypes A and B by multiplex PCR. *Molecular and Cellular Probes*. 21: 308-311.

124. Moredo, F. A.; Pineyro, P. E.; Márquez, G. C.; Sanz, M.; Colello, R.; Etcheverría, A.; Padola, N. L.; Quiroga, M. A.; Perfumo, C. J.; Galli, L.; Leotta, G. A. (2015). Enterotoxigenic *Escherichia coli* Subclinical Infection in Pigs: Bacteriological and Genotypic Characterization and Antimicrobial Resistance Profiles. *Foodborne Pathogens and Disease*. 12: 704-711.
125. Muniesa, M.; Blanco, J. E.; de Simón, M.; Serra-Moreno, R.; Blanch, A. R.; Jofre, J. (2004). Diversity of stx2 converting bacteriophages induced from Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from cattle. *Microbiology*. 150: 2959-2971.
126. Nataro, J. P.; Kaper, J. B. (1998) Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*. 11: 142-201.
127. Neely, M. N.; Friedman, D. I. (1998). Functional and genetic analysis of regulatory regions of coliphage H-19B: location of shiga-like toxin and lysis genes suggests a role for phage functions in toxin release. *Molecular Microbiology*. 28: 1255-1267.
128. Neill, M. A. (1994). Pathogenesis of *Escherichia coli* O157: H7 infection. *Current Opinion in Infectious Diseases*. 7: 295-303.
129. Nicholls, L.; Grant, T. H.; Robins-Browne, R. M. (2000). Identification of a novel genetic locus that is required for in vitro adhesion of a clinical isolate of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* to epithelial cells. *Molecular Microbiology*. 35: 275-288.
130. Niskanen, T.; Ciaravino, G.; Takkinen, J. (2015). Surveillance of seven priority food and waterborne diseases in the EU/EEA 2010–2012. Disponible en: <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/food-and-waterborne-diseases-surveillance-report.pdf>
131. Noda, M.; Yutsudo, T.; Nakabayashi, N.; Hirayama, T.; Takeda, Y. (1987). Purification and some properties of Shiga-like toxin from *Escherichia coli* O157: H7 that is immunologically identical to Shiga toxin. *Microbial Pathogenesis*. 2: 339-349.

132. Noller, A. C.; McEllistrem, M. C.; Pacheco, A. G.; Boxrud, D. J.; Harrison, L. H. (2003). Multilocus variable-number tandem repeat analysis distinguishes outbreak and sporadic *Escherichia coli* O157: H7 isolates. *Journal of Clinical Microbiology*. 41: 5389-5397.
133. O'Brien, A. D.; La Veck, G. D.; Thompson, M. R.; Formal, S. B. (1982) Production of Shigella dysenteriae type-1-like cytotoxin by *Escherichia coli*. *Journal of Infectious Diseases*. 146: 763-769.
134. Organización Panamericana de la Salud (OPS), Servicio Fisiopatogenia Departamento de Bacteriología INEI-ANLIS "Carlos G. Malbrán. Manual de procedimientos "Diagnóstico y caracterización de *Escherichia coli* productor de toxina shiga O157 y no- O157 a partir de especímenes clínicos". [en línea] 2011. Disponible en: <http://www.anlis.gov.ar/brote-de-stec/EscherichiaClinica.pdf>.
135. Ørskov, F.; Ørskov, I. (1984). Serotyping of *Escherichia coli*. *Methods in Microbiology*. 14: 43-112.
136. Ostroff, S. M.; Tarr, P. I.; Neill, M. A.; Lewis, J. H.; Hargrett-Bean, N.; Kobayashi, J. M. (1989). Toxin genotypes and plasmid profiles as determinants of systemic sequelae in *Escherichia coli* O157: H7 infections. *Journal of Infectious Diseases*. 160: 994-998.
137. Padola, N. L.; Sanz, M. E.; Blanco, J. E.; Blanco, M.; Blanco, J.; Etcheverría, A. I.; Arroyoa, G. H.; Userac, M. A.; Parma, A. E. (2004). Serotypes and virulence genes of bovine Shigatoxigenic *Escherichia coli* (STEC) isolated from a feedlot in Argentina. *Veterinary Microbiology*. 100: 3-9.
138. Pai, C. H.; Ahmed, N.; Lior, H.; Johnson, W. M.; Sims, H. V.; Woods, D. E. (1988). Epidemiology of sporadic diarrhea due to verocytotoxin-producing *Escherichia coli*: a two-year prospective study. *The Journal of infectious diseases*. 1054-1057.
139. Parma, A. E.; Sanz, M. E.; Blanco, J. E.; Blanco, J.; Viñas, M. R.; Blanco, M.; Padola, N. L.; Etcheverría, A. I. (2000). Virulence genotypes and serotypes of verotoxigenic *Escherichia coli* isolated from cattle and foods in Argentina. *European Journal of Epidemiology*. 16: 757-762.
140. Paton, J. C.; Paton, A. W. (1998). Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clinical Microbiology Reviews*. 11: 450-79.

141. Paton, A. W.; Woodrow, M. C.; Doyle, R. M.; Lanser, J. A.; Paton, J. C. (1999). Molecular Characterization of a Shiga Toxigenic *Escherichia coli* O113: H21 Strain Lacking eae Responsible for a Cluster of Cases of Hemolytic-Uremic Syndrome. *Journal of Clinical Microbiology*. 37: 3357-3361.
142. Paton, A. W.; Srimanote, P.; Woodrow, M. C.; Paton, J. C. (2001). Characterization of Saa, a Novel Autoagglutinating Adhesin Produced by Locus of Enterocyte Effacement-Negative Shiga-Toxigenic *Escherichia coli* Strains That Are Virulent for Humans. *Infection and Immunity*. 69: 6999-7009.
143. Paton, A. W.; Paton, J. C. (2002). Direct detection and characterization of shiga toxigenic *Escherichia coli* by multiplex PCR for *stx*₁, *stx*₂, *eae*, *ehxA* and *saa*. *Journal of Clinical Microbiology*. 40: 271-274.
144. Paton, A. W.; Srimanote, P.; Talbot, U. M.; Wang, H.; Paton, J. C. (2004). A new family of potent AB₅ cytotoxins produced by Shiga toxigenic *Escherichia coli*. *The Journal of Experimental Medicine*. 200: 35-46.
145. Paton, A. W.; Paton, J. C. (2005). Multiplex PCR for direct detection of Shiga toxigenic *Escherichia coli* strains producing the novel subtilase cytotoxin. *Journal of Clinical Microbiology*. 43: 2944-2947.
146. Pianciola, L.; Chinen, I.; Mazzeo, M.; Miliwebsky, E.; Gonzalez, G.; Müller, C.; Rivas, M. (2014). Genotypic characterization of *Escherichia coli* O157: H7 strains that cause diarrhea and hemolytic uremic syndrome in Neuquén, Argentina. *International Journal of Medical Microbiology*. 304: 499-504.
147. Piérard, D.; Stevens, D.; Moriau, L.; Lior, H.; Lauwers, S. (1997). Isolation and virulence factors of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* in human stool samples. *Clinical Microbiology and Infection*. 3: 531-540.
148. Piérard, D.; Muyltermans, G.; Moriau, L.; Stevens, D.; Lauwers, S. (1998). Identification of New Verocytotoxin Type 2 Variant B-Subunit Genes in Human and Animal *Escherichia coli* isolates. *Journal of Clinical Microbiology*. 36: 3317-3322.

149. Pollard, D. R.; Johnson, W. M.; Lior, H.; Tyler, S. D.; Rozee, K. R. (1990). Rapid and specific detection of verotoxin genes in *Escherichia coli* by the polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*. 28: 540-545.
150. Prado, V.; Cavagnaro, S. M. (2008). Síndrome hemolítico urémico asociado a infección intestinal por *Escherichia coli* productora de shigatoxina (STEC) en pacientes chilenos: aspectos clínicos y epidemiológicos. *Revista Chilena de Infectología*. 25: 435-444.
151. Pruiomboom-Brees, I. M.; Morgan, T. W.; Ackermann, M. R.; Nystrom, E. D.; Samuel, J. E.; Cornick, N. A.; Moon, H. W. (2000). Cattle lack vascular receptors for *Escherichia coli* O157: H7 Shiga toxins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 97: 10325-10329.
152. Rangel, J. M.; Sparling, P. H.; Crowe, C.; Griffin, P. M.; Swerdlow, D. L. (2005). Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks, United States, 1982-2002. *Emerging Infectious Diseases*. 11: 603-609.
153. Reyes, M.; Durán, C.; Prado, V. (2004). Perfil de susceptibilidad a los antimicrobianos en cepas de *E. coli* productoras de Shiga toxina (STEC) aisladas de infecciones humanas y de alimentos. *Revista Médica de Chile*. 132: 1211-1216.
154. Riley, L. W.; Remis, R. S.; Helgerson, S. D.; McGe, H. B.; Wells, J. G.; Davis, B. R.; Hebert, R. J.; Olcott, E. S.; Johnson, L. M.; Hargrett, N. T. Blake, P. A.; Cohen, M. L. (1983). Hemorrhagic colitis associated with rare *Escherichia coli* serotype. *New England Journal of Medicine*. 308: 681-685.
155. Rios, M.; Prado, V.; Trucksis, M.; Arellano, C.; Borie, C.; Alexandre, M.; Fica, A.; Levine, M. M. (1999). Clonal diversity of Chilean isolates of enterohemorrhagic *Escherichia coli* from patients with hemolytic-uremic syndrome, asymptomatic subjects, animal reservoirs, and food products. *Journal of Clinical Microbiology*. 37: 778-781.
156. Rivas, M.; Miliwebsky, E.; Chinen, I.; Deza, N.; Leotta, G. A. (2006 a). La epidemiología del síndrome urémico hemolítico en la Argentina. Diagnóstico del agente etiológico, reservorios y rutas de transmisión. *Medicina (Buenos Aires)*. 66: 27-32.

157. Rivas, M.; Miliwebsky, E.; Chinen, I.; Roldan, C. D.; Balbi, L.; Garcia, B.; Fiorilli, G.; Sosa-Estani, S.; Kincaid, J.; Rangel, J.; Griffin, P. M. (2006 b). Characterization and epidemiologic subtyping of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from hemolytic uremic syndrome and diarrhea cases in Argentina. *Foodborne Pathogens and Disease*. 3: 88-96.
158. Rivas, M.; Sosa-Estani, S.; Rangel, J.; Caletti, M. G.; Vallés, P.; Roldán, C. D.; Balbi, L.; Marsano de Mollar, M. C.; Amoedo, D.; Miliwebsky, E.S.; Chinen, I.; Hoekstra, R.M.; Mead, P.; Griffin, P.M. (2008). Risk factors for sporadic ShigaToxin-producing *Escherichia coli* infections in children, Argentina. *Emerging Infectious Diseases*. 14: 763-71.
159. Rivas, M.; Padola, N. L.; Luchessi, P. M.; Masana, M. (2010). Diarrheagenic *Escherichia coli* in Argentina. Chapter 10, p. 142-161. En: *Pathogenic Escherichia coli in Latin America*. Torres, A. G. (ed.). Bentham E-Book, 2010. ISBN: 978-1-60805-192-2.
160. Rivas, M.; Chinen, I.; Miliwebsky, E.; Galli, L.; Repetto, H. A.; Masana, M. (2011). Epidemiology of Argentinean Shiga toxin producing *Escherichia coli*. p. 109-132. En: *Bacterial Population Genetics: A Tribute to Thomas S. Whittam*. Walk, S., Feng P. (eds.). ASM Press. Washington, DC.
161. Rivas, M. (2012). Vigilancia epidemiológica y molecular del SUH asociado a *Escherichia coli* productor de toxina Shiga. Presentación en el 5° Congreso Argentino de Nefrología Pediátrica, Junio 2012, Buenos Aires.
162. Rivero, M. A.; Passucci, J. A.; Rodriguez, E. M.; Parma, A. E. (2010). Role and clinical course of verotoxigenic *Escherichia coli* infections in childhood acute diarrhoea in Argentina. *Journal of Medical Microbiology*. 59: 345-352.
163. Rivero, M. A.; Passucci, J. A.; Rodríguez, E. M.; Parma, A. E. (2012). Seasonal variation of HUS occurrence and VTEC infection in children with acute diarrhoea from Argentina. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 31: 1131-1135.
164. Sakuma, M.; Urashima, M.; Okabe, N. (2006). Verocytotoxin-producing *Escherichia coli*, Japan, 1999-2004. *Emerging Infectious Diseases*. 12: 323-5.

165. Sanz, M. E.; Viñas, M. R.; Parma, A. E. (1998). Prevalence of bovine verotoxin-producing *Escherichia coli* in Argentina. *European Journal of Epidemiology*. 14: 399-403.
166. Savarino, S. J.; Fasano, A.; Robertson, D. C.; Levine, M. M. (1991). Enteroaggregative *Escherichia coli* elaborate a heat-stable enterotoxin demonstrable in an in vitro rabbit intestinal model. *Journal of Clinical Investigation*. 87: 1450.
167. Scheutz, F.; Teel, L. D.; Beutin, L.; Piérard, D.; Buvens, G.; Karch, H.; Mellmanne, A.; Caprioli, A.; Tozzoli, R.; Morabito, S.; Strockbineg, N. A.; Melton-Celsa, A. R.; Sanchez, M.; Persson, S.; O'Brien, A. D. (2012). Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing Stx nomenclature. *Journal of clinical microbiology*. 50: 2951-2963.
168. Schmidt, H.; Beutin, L.; Karch, H. (1995). Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157: H7 strain EDL 933. *Infection and immunity*. 63: 1055-1061.
169. Schmidt, H.; Scheef, J.; Morabito, S.; Caprioli, A.; Wieler, L. H.; Karch, H. (2000). A New Shiga Toxin 2 Variant (Stx2f) from *Escherichia coli* Isolated from Pigeons. *Applied and Environmental Microbiology*. 66: 1205-1208.
170. Schmidt, H.; Zhang, W. L.; Hemmrich, U.; Jelacic, S.; Brunder, W.; Tarr, P. I.; Dobrindt, U.; Hacker, J.; Karch, H. (2001). Identification and characterization of a novel genomic island integrated at selC in locus of enterocyte effacement-negative, Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*. 69: 6863-6873.
171. Schroeder, C. M.; Zhao, C.; DebRoy, C.; Torcolini, J.; Zhao, S.; White, D. G.; Meng, J. (2002). Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* O157 isolated from humans, cattle, swine, and food. *Applied and Environmental Microbiology*. 68: 576-581.
172. Sinclair, J. F.; O'Brien, A. D. (2002). Cell Surface-localized Nucleolin Is a Eukaryotic Receptor for the Adhesin Intimin- γ of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7. *Journal of Biological Chemistry*. 277: 2876-2885.

173. Slutsker, I.; Ries, A. A.; Greene, K. D.; Wells, J. G.; Hutwagner, L.; Griffin, P. M. (1997). *Escherichia coli* O157:H7 diarrhea in the United States: Clinical and epidemiologic features. *Annals of Internal Medicine*. 126: 505-13.
174. Slutsker, L.; Ries, A. A.; Maloney, K.; Wells, J. G.; Greene, K. D.; Griffin, P. M. (1998). A nationwide case-control study of *Escherichia coli* O157: H7 infection in the United States. *Journal of Infectious Diseases*. 177: 962-966.
175. Snedeker, K. G.; Shaw, D. J.; Locking, M. E.; Prescott, R. (2009). Primary and secondary cases in *Escherichia coli* O157 outbreaks: a statistical analysis. *BMC Infectious Diseases*. 9: 144.
176. Sociedad Argentina de Pediatría. Comité de Nefrología. (1995). Incidencia del síndrome urémico hemolítico (SUH) en la República Argentina. *Archivos Argentinos de Pediatría*. 93: 407-11.
177. Spears, K. J.; Roe, A. J.; Gally, D. L. (2006). A comparison of enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* pathogenesis. *FEMS Microbiology Letters*. 255: 187-202.
178. Spizzirri, F. D.; Rahman, R. C.; Bibiloni, N.; Ruscasso, J. D.; Amoreo, O. R. (1997). Childhood hemolytic uremic syndrome in Argentina: long-term follow-up and prognostic features. *Pediatric Nephrology*. 11: 156-60.
179. Srimanote, P.; Paton, A. W.; Paton, J. C. (2002). Characterization of a novel type IV pilus locus encoded on the large plasmid of locus of enterocyte effacement-negative Shiga-toxigenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans. *Infection and Immunity*. 70: 3094-3100.
180. Stephan, R.; Untermann, F. (1999). Virulence factors and phenotypical traits of verotoxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from asymptomatic human carriers. *Journal of Clinical Microbiology*. 37: 1570-2.
181. Stephan, R.; Hoelzle, L. E. (2000). Characterization of shiga toxin type 2 variant B-subunit in *Escherichia coli* strains from asymptomatic human carriers by PCR-RFLP. *Letters in Applied Microbiology*. 31: 139-142.

182. Stevens, M. P.; van Diemen, P. M.; Frankel, G.; Phillips, A. D.; Wallis, T. S. (2002). Efa1 influences colonization of the bovine intestine by Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes O5 and O111. *Infection and immunity*. 70: 5158-5166.
183. Struelens, M. J. (1996). Consensus guidelines for appropriate use and evaluation of microbial epidemiologic typing systems. *Clinical Microbiology and Infection*. 2: 2-11.
184. Swaminathan, B.; Barrett, T. J.; Hunter, S. B.; Tauxe, R. V.; CDC PulseNet Task Force (2001). PulseNet: the molecular subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance, United States. *Emerging Infectious Diseases*. 7: 382-389.
185. Takao, T.; Tanabe, T.; Hong, Y. M.; Shimonishi, Y.; Kurazono, H.; Yutsudo, T.; Takeda, Y. (1988). Identity of molecular structure of Shiga-like toxin I (VT1) from *Escherichia coli* O157: H7 with that of Shiga toxin. *Microbial Pathogenesis*. 5: 357-369.
186. Tanaro, J. D.; Leotta, G. A.; Lound, L. H.; Galli, L.; Piaggio, M. C.; Carbonari, C. C.; Araujo, S.; Rivas, M. (2010). *Escherichia coli* O157 in bovine feces and surface water streams in a beef cattle farm of Argentina. *Foodborne Pathogens and Disease*. 7: 475-477.
187. Tarr, P. I.; Neill, M. A.; Clausen, C. R.; Watkins, S. L.; Christie, D. L.; Hickman, R. O. (1990). *Escherichia coli* O157: H7 and the hemolytic uremic syndrome: importance of early cultures in establishing the etiology. *Journal of Infectious Diseases*. 162: 553-556.
188. Tarr, P. I.; Bilge, S. S.; Vary, J. C.; Jelacic, S.; Habeeb, R. L.; Ward, T. R.; Baylor, M.R.; Besser, T. E. (2000). Iha: a novel *Escherichia coli* O157: H7 adherence-conferring molecule encoded on a recently acquired chromosomal island of conserved structure. *Infection and Immunity*. 68: 1400-1407.
189. Tarr, P. I.; Gordon, C. A.; Chandler, W. L. (2005). Shiga-toxin producing *Escherichia coli* and haemolytic ureamic syndrome. *Lancet*. 365: 1073-86.
190. Tatsuno, I.; Horie, M.; Abe, H.; Miki, T.; Makino, K.; Shinagawa, H.; Taguchi, H.; Kamiya, S.; Hayashi, T.; Sasakawa, C. (2001). *toxB* Gene on pO157 of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:

- H7 Is Required for Full Epithelial Cell Adherence Phenotype. *Infection and Immunity*. 69: 6660-6669.
191. Tenover, F. C.; Arbeit, R. D.; Goering, R. V.; Mickelsen, P. A.; Murray, B. E.; Persing, D. H.; Swaminathan, B. (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *Journal of Clinical Microbiology*. 33: 2233-2239.
192. Toma, C.; Espinosa, E. M.; Song, T.; Miliwebsky, E.; Chinen, I.; Iyoda, S.; Iwanaga, M.; Rivas, M. (2004). Distribution of putative adhesins in different seropathotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology*. 42: 4937-4946.
193. Toma, C.; Higa, N.; Iyoda, S.; Rivas, M.; Iwanaga, M. (2006). The long polar fimbriae genes identified in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* are present in other diarrheagenic *E. coli* and in the standard *E. coli* collection of reference (ECOR) strains. *Research in Microbiology*. 157: 153-161.
194. Toma, C.; Nakasone, N.; Miliwebsky, E.; Higa, N.; Rivas, M.; Suzuki, T. (2008). Differential adherence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* harboring saa to epithelial cells. *International Journal of Medical Microbiology*. 298: 571-578.
195. Torres, A. G.; Giron, J. A.; Perna, N. T.; Burland, V.; Blattner, F. R.; Avelino-Flores, F.; Kaper, J. B. (2002). Identification and characterization of IpfABCC' DE, a fimbrial operon of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7. *Infection and Immunity*. 70: 5416-5427.
196. Torres, A. G.; Kanack, K. J.; Tutt, C. B.; Popov, V.; Kaper, J. B. (2004). Characterization of the second long polar (LP) fimbriae of *Escherichia coli* O157: H7 and distribution of LP fimbriae in other pathogenic *E. coli* strains. *FEMS Microbiology Letters*. 238: 333-344.
197. Torres, A. G.; Blanco, M.; Valenzuela, P.; Slater, T. M.; Patel, S. D.; Dahbi, G.; Blanco, J. (2009). Genes related to long polar fimbriae of pathogenic *Escherichia coli* strains as reliable markers to identify virulent isolates. *Journal of Clinical Microbiology*. 47: 2442-2451.

198. Tozzoli, R.; Caprioli, A.; Morabito, S. (2005). Detection of *toxB*, a plasmid virulence gene of *Escherichia coli* O157, in enterohemorrhagic and enteropathogenic *E. coli*. *Journal of clinical microbiology*. 43: 4052-4056.
199. Tyler, S. D.; Johnson, W. M.; Lior, H.; Wang, G.; Rozee, K. R. (1991). Identification of verotoxin type 2 variant B subunit genes in *Escherichia coli* by the polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. *Journal of Clinical Microbiology*. 29: 1339-1343.
200. Tzipori, S.; Gunzer, F.; Donnenberg, M. S.; de Montigny, L. I. N. A.; Kaper, J. B.; Donohue-Rolfe, A. (1995). The role of the *eaeA* gene in diarrhea and neurological complications in a gnotobiotic piglet model of enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection. *Infection and Immunity*. 63: 3621-3627.
201. Veilleux, S.; Dubreuil, J. D. (2006). Presence of *Escherichia coli* carrying the EAST1 toxin gene in farm animals. *Veterinary Research*. 37: 3-13.
202. Versalovic, J.; Koeuth, T.; Lupski, R. (1991). Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research*. 19: 6823-6831.
203. Weiss, S. M.; Ladwein, M.; Schmidt, D.; Ehinger, J.; Lommel, S.; Städing, K.; Beutling, U.; Disanza, A.; Frank R.; Jänsch, L.; Scita, G.; Gunzer, F.; Rottner, K.; Stradal, T. E. B. (2009). IRSp53 Links the Enterohemorrhagic *E. coli* Effectors Tir and EspF_U for Actin Pedestal Formation. *Cell Host and Microbe*. 5: 244-258.
204. Wickham, M. E.; Lupp, C.; Mascarenhas, M.; Vázquez, A.; Coombes, B. K.; Brown, N. F.; Finlay, B. B. (2006). Bacterial genetic determinants of non-O157 STEC outbreaks and hemolytic-uremic syndrome after infection. *Journal of Infectious Diseases*. 194: 819-827.
205. Wilson, L. A.; Sharp, P. M. (2006). Enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) sequences in *Escherichia coli*: Evolution and implications for ERIC-PCR. *Molecular Biology and Evolution*. 23: 1156-1168.

206. Wong, C. S.; Mooney, J. C.; Brandt, J. R.; Staples, A. O.; Jelacic, S.; Boster, D. R.; Watkins, S. L.; Tarr, P. I. (2012). Risk factors for the hemolytic uremic syndrome in children infected with *Escherichia coli* O157: H7: a multivariable analysis. *Clinical Infectious Diseases*. 55: 33-41.
207. World Health Organization (1999). Zoonotic non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC). Report of a WHO Scientific Working Group Meeting; 22-23 June 1998; Berlin, Germany. WHO/CSR/APH/98.8: 1-30.
208. Yamamoto, T.; Echeverria, P. (1996). Detection of the enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 gene sequences in enterotoxigenic *E. coli* strains pathogenic for humans. *Infection and immunity*. 64: 1441-1445.
209. Yokoyama, E.; Etoh, Y.; Ichihara, S.; Horikawa, K.; Konishi, N.; Kai, A.; Kurazono, T. (2011). Emergence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* serovar O157 strains in clade 8 with highly similar pulsed-field gel electrophoresis patterns. *Journal of Food Protection*. 74: 1324-1327.
210. Yu, J.; Kaper, J. B. (1992). Cloning and characterization of the *eae* gene of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7. *Molecular Microbiology*. 6: 411-417.
211. Zhang, X.; McDaniel, A. D.; Wolf, L. E.; Keusch, G. T.; Waldor, M. K.; Acheson, D. W. (2000). Quinolone antibiotics induce Shiga toxin-encoding bacteriophages, toxin production, and death in mice. *Journal of Infectious Diseases*. 181: 664-670.
212. Zhang, L.; Levy, K.; Trueba, G.; Cevallos, W.; Trostle, J.; Foxman, B.; Marrs, C. F.; Eisenberg, J. N. S. (2015). Effects of Selection Pressure and Genetic Association on the Relationship between Antibiotic Resistance and Virulence in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 59: 6733-6740.
213. Zotta, C. M.; Carbonari, C.; Gómez, D.; Deza, N.; Lavayén, S.; Miliwebsky, E.; Monzani, V.; Manfredi, E.; Morvay, L.; Rivas, M. (2009). Nuevo patrón genético de *Escherichia coli* O157: H7 biotipo "B" en Argentina. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*. 43: 589-592.

9. LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ADN | Acido desoxirribonucleico |
| A/E | Adherencia y destrucción de microvellosidades (<i>attaching and effacing</i>) |
| ANLIS | Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud |
| ARN | Ácido ribonucleico. |
| ARNr | Ácido ribonucleico ribosomal |
| CH | Colitis hemorrágica |
| CAA | Código Alimentario Argentino |
| CDC | Centro para la Prevención y el Control de Enfermedades (<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>) |
| CDT-V | Toxina distensora citoletal (<i>cytolethal distending toxin</i>) |
| CTS | Caldo Tripteína de Soja |
| DAEC | <i>E. coli</i> de adherencia difusa (<i>diffuse-adherent E. coli</i>) |
| DEC | <i>Escherichia coli</i> diarreigénicos (<i>diarrheagenic E. coli</i>) |
| dNTPs | Desoxinucleótidos trifosfato |
| DS | Diarrea sanguinolenta |
| EAEC | <i>E. coli</i> enteroagregativo (<i>enteroaggregative E. coli</i>) |
| EAST | Toxina estable al calor de <i>E. coli</i> enteroagregativo (<i>enteroaggregative E. coli heat-stable toxin</i>) |
| EDTA | Ácido etilendiaminotetraacético |
| EE.UU | Estados Unidos de Norteamérica |
| Efa | Factor de <i>E. coli</i> enterohemorrágico para la adherencia-1 (<i>enterohemorrhagic E. coli factor for adherence</i>) |
| EHEC | <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágico (<i>enterohemorrhagic E. coli</i>) |
| EIEC | <i>Escherichia coli</i> enteroinvasivo (<i>enteroinvasive E. coli</i>) |
| EPEC | <i>Escherichia coli</i> enteropatógeno (<i>enteropathogenic E. coli</i>) |
| Esp | Proteína de secreción de <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli secreted proteins</i>) |
| ETAs | Enfermedades Transmitidas por Alimentos |
| ETEC | <i>Escherichia coli</i> enterotoxigénico (<i>enterotoxigenic E. coli</i>) |
| Gb3 | Globotriaosilceramida |
| H | Antígeno flagelar |
| Iha | Adhesina homóloga a IrgA |
| INEI | Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas |
| LEE | Locus de borrado del enterocito (<i>Locus for enterocyte effacement</i>) |
| LNR | Laboratorio Nacional de Referencia |
| LPF | Fimbria polar larga |

| | |
|--------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| LPS | Lipopolisacárido |
| NM | No móviles |
| O | Antígeno somático |
| OMS | Organización Mundial de la Salud |
| ONT | O-no tipificable |
| PBS | Solución salina bufferada con fosfatos (<i>phosphate-buffered saline</i>) |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa (<i>polymerase chain reaction</i>) |
| RAPD | Amplificación al azar del ADN polimórfico |
| PFGE | Electroforesis en campos pulsados (<i>pulsed-field gel electrophoresis</i>) |
| RFLP | Polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (<i>restriction fragment length polymorphism</i>) |
| Saa | Adhesina autoaglutinante de STEC (<i>STEC autoagglutinating adhesin</i>) |
| SIM | Separación Inmunomagnética |
| SMAC | Agar MacConkey sorbitol |
| STEC | <i>Escherichia coli</i> productor de toxina Shiga (<i>Shiga toxin-producing E. coli</i>) |
| Stx | Toxina Shiga |
| SUH | Síndrome urémico hemolítico |
| TAE | Tris-Ácido Acético-EDTA |
| TBE | Tris-ácido Bórico-EDTA |
| TE | Tris-EDTA |
| Tir | Receptor traslocado de la intimina (<i>translocated intimin receptor</i>) |
| TSA | Agar Tripteína de Soja |
| SSTIII | Sistema de secreción tipo III |
| UE | Unión Europea |
| UPGMA | Método de pares no ponderados usando medias aritméticas |
| UV | Radiación ultravioleta |
| y col. | y colaboradores |

UNIDADES DE MEDIDA

| | |
|-----|--------------------|
| °C | Grados centígrados |
| hs | Horas |
| Kpb | Kilopares de bases |
| pb | Pares de bases |
| mg | Miligramos |
| µg | Microgramos |

| | |
|-----|-------------------------|
| min | Minutos |
| ml | Mililitros |
| μl | Microlitros |
| mM | Milimolar |
| μM | Micromolar |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| Seg | Segundos |
| V | Voltios |

10. ANEXO 1 (protocolos utilizados)

PCR múltiple utilizada para la detección de pacientes portadores de STEC (Sección 3.2.3)

| Protocolo PCR | | | Condiciones para la amplificación | | |
|---------------------|----------------|-------------|-----------------------------------|---------------|-----------|
| Reactivo | [] de trabajo | Vol X1 (µl) | Etapa | Condición | Nº ciclos |
| Buffer PCR | 10X | 5 | Desnaturalización inicial | 5 min a 94°C | 1 |
| Mezcla dNTPs | 2,5 mM | 2 | Desnaturalización | 30 seg a 94°C | |
| Cl ₂ Mg | 25 mM | 3 | Pegado de cebadores | 30 seg a 58°C | 30 |
| Primer Stx1a | 100 µM | 1 | Extensión | 30 seg a 72°C | |
| Primer Stx1b | 100 µM | 1 | Extensión final | 2 min a 72°C | 1 |
| Primer Stx2a | 100 µM | 0,2 | | | |
| Primer Stx2b | 100 µM | 0,2 | | | |
| Primer O157F | 100 µM | 0,2 | | | |
| Primer O157R | 100 µM | 0,2 | | | |
| Taq polimerasa | 5 U/µl | 0,2 | | | |
| ADN molde | | 2 | | | |
| H ₂ Oddd | | 35 | | | |
| Vol. Final | | 50 | | | |

Condiciones de corrida: gel de agarosa 2% en TBE 1X, 120 volts, 40 min.

Control positivo: *E. coli* EDL 933 (*stx1/stx2/rfb_{O157}*)

Referencia: Leotta, G. A., Chinen, I., Epszteyn, S., Miliwebsky, E., Melamed, I. C., Motter, M., Ferrer M., Marey E. and Rivas, M. (2005). Validación de una técnica de PCR múltiple para la detección de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga. Revista Argentina de Microbiología. 37: 1-10.

Identificación de los serotipos O157, O26, O111, O121, O145 y O103 por PCR múltiple (sección 3.4.2)

| Gen | Cebador | nM | Amplicón (pb) |
|---------------------|----------|-----|---------------|
| <i>stx1/2</i> | SRM128 | 240 | 528 |
| | SRM129 | 240 | |
| <i>eae</i> | SRM103 | 120 | 482 |
| | SRM104 | 120 | |
| 16S | VMP5 | 120 | 204 |
| | VMP6 | 120 | |
| WZX _{O26} | 5'O26 | 400 | 268 |
| | 3'O26 | 400 | |
| WZX _{O103} | 5'O103 | 200 | 320 |
| | 3'O103 | 200 | |
| WZX _{O111} | 5'O111.3 | 200 | 829 |
| | 3'O111.2 | 200 | |
| WZX _{O121} | 5'O121 | 100 | 651 |
| | 3'O121 | 100 | |
| WZX _{O145} | 5'O145.6 | 200 | 418 |
| | 3'O145.B | 200 | |
| WZX _{O157} | 5'O157 | 300 | 133 |
| | 3'O157 | 300 | |

Protocolo PCR

Condiciones para la amplificación

| Reactivo | [] de trabajo | Volumen X1 (µl) |
|------------------------|----------------|-----------------|
| Buffer PCR | 10X | 2,5 |
| Mezcla dNTPs | 2,5 mM | 3 |
| Cl ₂ Mg | 25 mM | 1,5 |
| Mezcla cebadores | ver tabla | 2,5 |
| Taq Hot Start (Qiagen) | 5 U/µl | 0,25 |
| H ₂ Oddd | | 14,75 |
| ADN molde | | 0,5 |
| Vol. Final | | 25 |

| Etapas | Condición | Nº ciclos |
|---------------------------|------------------------------------|-----------|
| Desnaturalización inicial | 15 min a 95°C | 1 |
| Desnaturalización | 30 seg a 95°C | |
| Pegado de cebadores | 20 seg de 68°C a 59°C [-1°C/ciclo] | 10 |
| Extensión | 52 seg a 72°C | |
| Desnaturalización | 30 seg a 95°C | |
| Pegado de cebadores | 20 seg a 59°C | 35 |
| Extensión | 52 seg a 72°C | |
| Extensión final | 1 min a 72°C | 1 |

Condiciones de corrida: gel de agarosa 1,75% en TBE 1X, 125 volts, 90 min.

Referencia: Monday, S. R., Beisaw, A., and Feng, P. C. H. (2007). Identification of Shiga toxicogenic *Escherichia coli* seropathotypes A and B by multiplex PCR. *Molecular and Cellular Probes*. 21: 308-311.

Detección del gen *fliC_{H7}* (antígeno flagelar H7) (sección 3.4.3)

Protocolo PCR

| Reactivo | [] de trabajo | Volumen X1 (µl) |
|--------------------|----------------|-----------------|
| Buffer PCR | 10X | 5 |
| Mezcla dNTPs | 2,5 mM | 3 |
| Cl ₂ Mg | 25 mM | 3 |
| Primer FLICH7-F | 100 µM | 0,3 |
| Primer FLICH7-R | 100 µM | 0,3 |
| Taq polimerasa | 5 U/µl | 0,2 |
| H ₂ O | | 36,2 |
| ADN molde | | 2 |
| Vol. Final | | 50 |

Condiciones para la amplificación

| Etapa | Condición | Nº ciclos |
|---------------------------|----------------|-----------|
| Desnaturalización inicial | 1 min a 94°C | 1 |
| Desnaturalización | 15 seg a 94°C | |
| Pegado de cebadores | 15 seg de 60°C | 35 |
| Extensión | 75 seg a 72°C | |
| Extensión final | 5 min a 72°C | 1 |

Condiciones de corrida: gel de agarosa al 2% en TBE 1X, 120 volts, 30 min.

Control positivo: *E. coli* EDL 933 (*fliC_{H7}*)

Detección de genes codificantes de intimina, enterohemolisina y adhesina autoaglutinante (sección 3.4.4)

| Protocolo PCR | | | Condiciones para la amplificación | | |
|---------------------|----------------|-----------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------|
| Reactivo | [] de trabajo | Volumen X1 (µl) | Etapa | Condición | N° ciclos |
| Buffer PCR | 10X | 5 | Desnaturalización | 1 min a 95°C | |
| Mezcla dNTPs | 2,5 mM | 2,5 | Pegado de cebadores | 2 min a 65°C | 10 |
| Cl ₂ Mg | 25 mM | 4 | Extensión | 1,5 min a 72°C | |
| Primer stx1F | 100 µM | 1,25 | Desnaturalización | 1 min a 95°C | |
| Primer stx1R | 100 µM | 1,25 | Pegado de cebadores | 2 min de 64°C a 60°C [-1°C/ciclo] | 5 |
| Primer stx2F | 100 µM | 1,25 | Extensión | 1,5 min a 72°C | |
| Primer stx2R | 100 µM | 1,25 | Desnaturalización | 1 min a 95°C | |
| Primer eaeAF | 100 µM | 1,25 | Pegado de cebadores | 2 min a 60°C | 9 |
| Primer eaeAR | 100 µM | 1,25 | Extensión | 1,5 min a 72°C | |
| Primer hlyAF | 100 µM | 1,25 | Desnaturalización | 1 min a 95°C | |
| Primer hlyAR | 100 µM | 1,25 | Pegado de cebadores | 2 min a 60°C | 11 |
| Primer saaDF | 100 µM | 1,25 | Extensión | 2,5 min a 72°C | |
| Primer saaDR | 100 µM | 1,25 | | | |
| Taq polimerasa | 5 U/µl | 0,2 | | | |
| H ₂ Oddd | | 20,8 | | | |
| ADN molde | | 5 | | | |
| Vol. Final | | 50 | | | |

Condiciones de corrida: gel de agarosa al 2% en TBE 1X, 100 volts, 40 min.

Controles positivos: *E. coli* EDL 933 (*stx*₁, *stx*₂, *eae*, *ehxA*), *E. coli* LaMA 1070 serotipo O113:H21 (*saa*)

Detección de adhesinas putativas de STEC no codificadas en LEE (sección 3.4.4)

| Protocolo PCR | | <i>efa1</i> | <i>iha</i> | <i>toxB</i> |
|-----------------------|----------------|--------------|--------------|--------------|
| Reactivo | [] de trabajo | Vol. X1 (µl) | Vol. X1 (µl) | Vol. X1 (µl) |
| Buffer PCR | 10X | 2,5 | 2,5 | 2,5 |
| Mezcla dNTPs | 2,5 mM | 2 | 1 | 1 |
| Cl ₂ Mg | 50 mM | 0,75 | 0,75 | 1 |
| Primer toxB.911 F | 100 µM | - | - | 0,125 |
| Primer toxB.1468 R | 100 µM | - | - | 0,125 |
| Primer iha-I | 100 µM | - | 0,125 | - |
| Primer iha-II | 100 µM | - | 0,125 | - |
| Primer 88T14 | 10 µM | 0,5 | - | - |
| Primer 88T9 | 10 µM | 0,5 | - | - |
| <i>Taq polimerasa</i> | 5 U/µl | 0,15 | 0,15 | 0,15 |
| H ₂ O | | 17,6 | 19,35 | 19,1 |
| ADN molde | | 1 | 1 | 1 |
| Vol. Final | | 25 | 25 | 25 |

Condiciones para la amplificación

| Etapa | Condición | Nº ciclos |
|---------------------------|--------------|-----------|
| Desnaturalización inicial | 5 min a 93°C | 1 |
| Desnaturalización | 1 min a 93°C | |
| Pegado de cebadores | 1 min a 55°C | 25 |
| Extensión | 1 min a 72°C | |
| Extensión final | 2 min a 72°C | 1 |

Condiciones de corrida: agarosa 2% en TBE 1X, 100 volts, 40 min

Control positivo: *E. coli* EDL 933 (*efa*, *iha*, *toxB*)

Detección de variantes de *lpfA1* y *lpfA2* (sección 3.4.4)

Protocolo PCR

| Reactivo | [] de trabajo | Volumen X1 (μl) |
|--------------------|----------------|-----------------|
| Buffer PCR | 10X | 2,5 |
| Mezcla dNTPs | 2,5 mM | 1 |
| Cl ₂ Mg | 25 mM | 0,75 |
| Primer F | 100 μM | 0,25 |
| Primer R | 100 μM | 0,25 |
| Taq polimerasa | 5 U/μl | 0,15 |
| H ₂ O | | 18,1 |
| ADN molde | | 2 |
| Vol. final | | 25 |

Condiciones para la amplificación

| Etapa | Condición | N° ciclos |
|---------------------------|---------------|-----------|
| Desnaturalización inicial | 5 min a 94°C | 1 |
| Desnaturalización | 30 seg a 94°C | |
| Pegado de cebadores | 30 seg a X °C | 35 |
| Extensión | 30 seg a 72°C | |
| Extensión final | 10 min a 72°C | 1 |

| Variante <i>lpfA</i> | T° pegado cebadores (X) |
|----------------------|-------------------------|
| <i>lpfA1-1</i> | 59 |
| <i>lpfA1-2</i> | 57 |
| <i>lpfA1-3</i> | 62 |
| <i>lpfA1-4</i> | 52 |
| <i>lpfA1-5</i> | 60 |
| <i>lpfA2-1</i> | 60 |
| <i>lpfA2-2</i> | 52 |
| <i>lpfA2-3</i> | 72 |

Condiciones de corrida: agarosa 2% en TBE 1X, 80 volts, 40 min

Control positivo: EDL933 (*lpfA1-3*, *lpfA2-2*); *E. coli* LaMA1070 serotipo O113H21 (*lpfA2-1*); EPEC LaMA33 serotipo O26:H11 (*lpfA1-2*); EPEC 2348/69 serotipo O127:H6 (*lpfA1-1*).

Detección de toxinas distintas a Stx (sección 3.4.4).

Protocolo PCR duplex *subA/cdt-V*

| Reactivo | [] de trabajo | Volumen X1 (µl) |
|-----------------------|----------------|-----------------|
| Buffer PCR | 10X | 5 |
| Mezcla dNTPs | 2,5 mM | 4 |
| Cl ₂ Mg | 50 mM | 2 |
| Primer subHCD F | 10 µM | 0,5 |
| Primer subSCD R | 10 µM | 0,5 |
| Primer cdt-V F | 100 µM | 0,4 |
| Primer cdt-V R | 100 µM | 0,4 |
| <i>Taq polimerasa</i> | 5 U/µl | 0,3 |
| H ₂ Oddd | | 34,9 |
| ADN molde | | 2 |
| Vol. final | | 50 |

Protocolo PCR *ast1*

| Reactivo | [] de trabajo | Volumen X1 (µl) |
|-----------------------|----------------|-----------------|
| Buffer PCR | 10X | 5 |
| Mezcla dNTPs | 2,5 mM | 2 |
| Cl ₂ Mg | 50 mM | 1,5 |
| Primer EAST11a | 100 µM | 0,25 |
| Primer EAST11b | 100 µM | 0,25 |
| <i>Taq polimerasa</i> | 5 U/µl | 0,3 |
| H ₂ Oddd | | 38,7 |
| ADN molde | | 2 |
| Vol. final | | 50 |

Condiciones para la amplificación *subA/cdt-V*

| Etapa | Condición | Nº ciclos |
|---------------------------|--------------|-----------|
| Desnaturalización inicial | 5 min a 95°C | 1 |
| Desnaturalización | 1 min a 95°C | |
| Pegado de cebadores | 1 min a 54°C | 30 |
| Extensión | 2 min a 72°C | |
| Extensión final | 2 min a 72°C | 1 |

Condiciones de corrida:

Gel de agarosa al 2% en TBE 1X, 80 volts 40 min

Controles positivo:

E. coli LaMA 1070 O113:H21 (*subAB*)

E. coli LaMA1033 O91:H21 (*cdt-V*)

Condiciones para la amplificación *ast1*

| Etapa | Condición | Nº ciclos |
|---------------------------|--------------|-----------|
| Desnaturalización inicial | 5 min a 93°C | 1 |
| Desnaturalización | 1 min a 93°C | |
| Pegado de cebadores | 1 min a 55°C | 25 |
| Extensión | 1 min a 72°C | |
| Extensión final | 2 min a 72°C | 1 |

Condiciones de corrida:

Gel de agarosa al 2% en TBE 1X, 80 volts 40 min

Control positivo: EIEC LaMA1083 (*ast1*)

Identificación de subtipos de *stx*₂ por PCR simple convencional (sección 3.4.6).

Protocolo PCR convencional individuales

| Reactivo | [] de trabajo | Volumen X1 (μl) |
|---------------------|----------------|-----------------|
| Buffer PCR | 5X | 4 |
| Mezcla dNTPs | 2,5 mM | 2 |
| Cl ₂ Mg | 25 mM | 1,5 |
| Primer F | 10 μM | 0,6 |
| Primer R | 10 μM | 0,6 |
| <i>Taq</i> HotStart | 5 U/μl | 0,2 |
| H ₂ Oddd | | 10,1 |
| ADN molde | | 1 |
| Vol. final | | 20 |

Nota: Cuando se busca por PCR *stx*_{2d}, la mezcla de reacción lleva 0,6 μl de cada cebador y se ajusta el volumen de H₂Oddd

Condiciones para la amplificación: *stx*_{2a}, *stx*_{2b} y *stx*_{2c}

| Etapa | Condición | Nº ciclos |
|---------------------------|----------------|-----------|
| Desnaturalización inicial | 15 min a 95°C | 1 |
| Desnaturalización | 50 seg a 94°C | |
| Pegado de cebadores | 40 seg a 62 °C | 35 |
| Extensión | 60 seg a 72°C | |
| Extensión final | 3 min a 72°C | 1 |

Condiciones para la amplificación: *stx*_{2d}, *stx*_{2e}, *stx*_{2f} y *stx*_{2g}

| Etapa | Condición | Nº ciclos |
|---------------------------|----------------|-----------|
| Desnaturalización inicial | 15 min a 95°C | 1 |
| Desnaturalización | 50 seg a 94°C | |
| Pegado de cebadores | 40 seg a 64 °C | 35 |
| Extensión | 60 seg a 72°C | |
| Extensión final | 3 min a 72°C | 1 |

Condiciones de corrida: agarosa 2% en TBE 1X, 80 volts, 40 min

Controles utilizados: *E. coli* D2587 (*stx*_{2b}), D3435 (*stx*_{2d})

Identificación de subtipos de *stx*₁ por PCR triple (sección 3.4.6).

**Protocolo PCR múltiple para
detección variantes *stx*₁**

| Reactivo | [] de trabajo | Volumen X1 (µl) |
|--------------------|----------------|-----------------|
| Buffer PCR | 10X | 5 |
| Mezcla dNTPs | 2,5 mM | 2 |
| Cl ₂ Mg | 50 mM | 1,5 |
| Primer Stx1aF1 | 10 µM | 0,5 |
| Primer Stx1aR2 | 10 µM | 0,5 |
| Primer Stx1cF1 | 10 µM | 0,25 |
| Primer Stx1cR1 | 10 µM | 0,25 |
| Primer Stx1dF1 | 10 µM | 0,125 |
| Primer Stx1dR2 | 10 µM | 0,125 |
| Taq polimerasa | 5 U/µl | 0,125 |
| H ₂ O | | 38,625 |
| ADN molde | | 1 |
| Vol. final | | 50 |

Condiciones para la amplificación *stx*₁

| Etapa | Condición | Nº ciclos |
|---------------------------|---------------|-----------|
| Desnaturalización inicial | 4 min a 95°C | 1 |
| Desnaturalización | 50 seg a 94°C | |
| Pegado de cebadores | 40 seg a 62°C | 35 |
| Extensión | 1 min a 72°C | |
| Extensión final | 3 min a 72°C | 1 |

Condiciones de corrida: Gel de agarosa al 2% en TBE 1X, 80 volts 40 min

Controles positivos: *E. coli* LaMA1304 (*stx*_{1a}), *E. coli* LaMA1305 (*stx*_{1c}), *E. coli* LaMA1306 (*stx*_{1d})

Identificación de la variante $\gamma 1$ del gen *eae* (sección 3.4.7)

Protocolo PCR *eae*- $\gamma 1$

| Reactivo | [] de trabajo | Volumen X1 (μ l) |
|-----------------------|----------------|-----------------------|
| Buffer PCR | 10X | 5 |
| Mezcla dNTPs | 2,5 mM | 4 |
| Cl ₂ Mg | 50 mM | 2 |
| Primer EAE19 | 100 μ M | 0,3 |
| Primer EAE20 | 100 μ M | 0,3 |
| <i>Taq</i> polimerasa | 5 U/ μ l | 0,2 |
| H ₂ Oddd | | 33,2 |
| ADN molde | | 5 |
| Vol. final | | 50 |

Condiciones para la amplificación *stx*₁

| Etapa | Condición | N° ciclos |
|---------------------------|--------------|-----------|
| Desnaturalización inicial | 2 min a 94°C | 1 |
| Desnaturalización | 1 min a 94°C | |
| Pegado de cebadores | 1 min a 62°C | 30 |
| Extensión | 2 min a 72°C | |
| Extensión final | 4 min a 72°C | 1 |

Condiciones de corrida: Gel de agarosa al 2% en TBE 1X, 80 volts 40 min

Control positivo: *E. coli* EDL 933 (*eae*- $\gamma 1$)

Detección de los genes *aggR* y *aaiC* por PCR en tiempo real (sección 3.4.8).

Protocolo PCR en tiempo real

| Reactivo | [] de trabajo | Vol X1 (μ l) |
|------------------------|----------------|-------------------|
| Master Mix | 2X | 12,5 |
| Primer <i>aggR</i> FWD | 10 μ M | 1,25 |
| Primer <i>aggR</i> REV | 10 μ M | 1,25 |
| Sonda <i>aggR</i> | 10 μ M | 0,5 |
| Primer <i>aaiC</i> FWD | 10 μ M | 1,25 |
| Primer <i>aaiC</i> REV | 10 μ M | 1,25 |
| Sonda <i>aaiC</i> | 10 μ M | 0,5 |
| ADN molde | | 2 |
| H ₂ Oddd | | 4,5 |
| Vol. Final | | 25 |

Condiciones para la amplificación

| Etapa | Condición | N° ciclos |
|-------------------------------|---------------|-----------|
| Desnaturalización inicial | 10 min a 95°C | 1 |
| Desnaturalización | 15 seg a 95°C | |
| Pegado de cebadores/extensión | 60 seg a 58°C | 40 |

Control positivo: EAEC 17-2 (*aggR*, *aaiC*)