



UNIVERSIDAD DE CHILE



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

ESTUDIO DE GENES DE VIRULENCIA *eae*, *ent* y *efa 1*,  
ASOCIADOS A LA PRESENCIA DEL "LOCUS ENTEROCYTE  
EFFACEMENT" (LEE) EN CEPAS DE *Escherichia coli* AISLADAS DE  
CERDOS SANOS.

LAURA ANDREA CORVALAN PAEZ

Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico Veterinario  
Departamento de Medicina  
Preventiva Animal.

Proyecto Fondecyt 1061088

PROFESOR GUIA: ROBERTO VIDAL

SANTIAGO, CHILE  
2008



# UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

## ESTUDIO DE GENES DE VIRULENCIA *eae*, *ent* y *efa 1*, ASOCIADOS A LA PRESENCIA DEL "LOCUS ENTEROCYTE EFFACEMENT" (LEE) EN CEPAS DE *Escherichia coli* AISLADAS DE CERDOS SANOS.

LAURA ANDREA CORVALAN PAEZ

Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico Veterinario  
Departamento de Medicina  
Preventiva Animal.

NOTA FINAL: \_\_\_\_\_

		NOTA	FIRMA
PROFESOR GUIA	ROBERTO VIDAL	_____	_____
PROFESOR CONSEJERO	CONSUELO BORIE	_____	_____
PROFESOR CONSEJERO	PEDRO ABALOS	_____	_____

SANTIAGO, CHILE  
2008

" El Hombre puede medir el valor de su propia alma en la mirada agradecida que le dirija un animal al cual ha socorrido" .

Platón

## **Agradecimientos**

A Roberto Vidal mis más sinceros agradecimientos por su optimismo y apoyo en el desarrollo de esta tesis, por mostrarme el mundo de la investigación y las ciencias aplicadas; permitir mi desarrollo dentro de él más allá de los límites de este trabajo. Vivenciar el trabajo de un equipo multidisciplinario y entregarme toda su experiencia académica y humana, que serán de gran valor para mi desempeño profesional futuro.

A Patricio Valenzuela por su apoyo, comprensión y paciencia, pero sobre todo por su amistad.

A Alicia por su amistad y compañía en las tardes de trabajo.

A Carolina Arellano por su constante apoyo, paciencia y colaboración.

A todas las personas del Programa de Microbiología de la Facultad de Medicina quiero agradecerles el haberme acogido como una más del equipo y haberme hecho sentir en casa, haciendo que este proceso de titulación se transforme en un bonito recuerdo.

A Solange Vivanco, mi gran amiga, que hizo el ir a muestrear un agrado y que siempre estuvo ahí para darme su apoyo y amistad.

A mis padres, gracias a las oportunidades que me dieron puedo concluir esta etapa de mi vida.

A Jeannette, por su gran apoyo y amor.

A mi amor, Camilo, por apoyarme de una y mil maneras en este proceso. Sin tu paciencia y compañía esto hubiera sido muy difícil.

A todos ustedes desde lo más profundo y sincero de mi corazón,  
Muchas Gracias.

## **INDICE**

	<b>Página</b>
Resumen	2
Summary	3
Introducción	5
Revisión Bibliográfica:	
Antecedentes Generales	7
Antecedentes Históricos	8
Antecedentes Epidemiológicos	9
Factores de Virulencia	10
Comportamiento Epidemiológico	17
Situación en América Latina	17
Objetivos Generales y Específicos	21
Material y Método	22
Resultados	34
Discusión	40
Conclusiones	49
Bibliografía	50
Anexos	58

## RESUMEN

Las *Escherichia coli* productoras de Shigatoxinas (STEC) se consideran como un patógeno emergente importante dentro de las enfermedades transmisibles por alimentos (ETA's), constituyendo uno de los principales problemas de salud pública según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS). Las diferentes patologías que producen en humanos van desde cuadros diarreicos leves hasta su complicación extraintestinal, el Síndrome Hemolítico Urémico (SHU). Es en la transmisión y diseminación de esta bacteria donde los animales de consumo, como bovinos y cerdos adquieren especial relevancia al ser considerados sus principales reservorios. El cerdo en nuestro país aparece como el reservorio principal en estudios que describen un aislamiento del 69%, con cepas que presentan en un 90% el factor de virulencia intimina (*eae*), asociado al desarrollo de patologías. Lo anterior, sumado a la nueva información, donde el consumo de carne porcina per cápita llegó a 22,5 kilos en el año 2007, pone al cerdo como un agente de riesgo real para la población humana. Debido a que faltan estudios recientes que aclaren el rol del cerdo como reservorio y diseminador de esta bacteria en el país es que se realizó un estudio descriptivo con 507 muestras de heces porcinas de cerdos destinados al consumo, donde se caracterizó mediante PCR múltiple la frecuencia de distribución de Stx1- Stx2, distintos factores de virulencia asociados al desarrollo de patologías (*eae*, *ent*, *efal*, *hly<sub>a</sub>*, *lpf*, *iha* y *saa*) y la distribución entre *E.coli* O157 o No-O157. Además mediante aglutinación con antisueros específicos se clasificaron las cepas No-O157. Finalmente mediante secuenciación se describió el tipo de variante de Stx2 que presentaban las muestras, para poder relacionar al cerdo con la presentación de enfermedad en los seres humanos.

Se encontró STEC en un 7,2% de las muestras analizadas (n = 507). De éstas todas pertenecían a cepas No-O157 y sintetizaban sólo Stx2. En la secuenciación se encontró que más del 90% correspondía a la variante Stx2-e y que 3 cepas STEC presentaban una nueva variante. Stx2-e se asocia tanto a pérdidas económicas en los planteles como al desarrollo de patologías en humanos, desde donde ha sido aislada. Se concluye que en vista de los resultados no se puede descartar al cerdo como un agente de riesgo para la población humana y que mayores estudios son necesarios.

## SUMMARY

The categories of Shiga toxin producing *Escherichia coli* (STEC) are considered as an important emergent bacterial pathogen within the food born outbreaks, constituting one of the main problems of public health according to the data of the World Health Organization (WHO). The different pathologies that take place in humans can be from cases of acute diarrhea, bloody diarrhea to its more complicated extra-intestinal illness, the Hemolytic Uremic Syndrome (HUS). Bovine and pigs acquire special relevance as reservoirs in the transmission and spread of STEC strains, because the consumption of meat contaminated from intestinal micro biota from these animals has been considered the main way of infection. In Chilean studies, the pig appear as the main reservoir with an 69% of isolation and with a 90% of STEC strains harboring the intimin gene (*eae*), a main virulence factor associated to the human pathologies development. The above-mentioned added to the new information, where the consumption of swinish meat per capita reached to 22.5 kg in 2007. It value put the pig species like a real risk agent of illness in human population. At now, information regarding the role of the pig as reservoir and STEC spread agent in Chile doesn't exist. It is the main reason for which us carried out a descriptive study working with 507 feces samples of pigs at slaughters and dedicated to the human consumption. The STEC isolation was realized using McConkey agar and virulence factors characterized by multiplex PCR protocol. The frequency and distribution of Stx1 - Stx2 and different factors of virulence associated to the development of human pathologies (*eae*, *ent*, *efa1*, *hlya*, *lpf*, *iha* and *saa*) among *E. coli* O157 or Non-O157, was studied. Also, using agglutination test with specific antiserum, different strain of STEC were serotyped. Finally we obtained the sequence of *stx2* on STEC presenting it. The variant of *stx2* associated to our STEC strains isolated from pigs was used to relate the pig specie with illness presentation in the human beings.

STEC was present in 7.2% of the samples analyzed (n=507). All of them belonged strains Non-O157 and they only codified *stx2* gene. The sequence showed that more than 90% corresponded to the *stx2-e* variant and 3 STEC strains present a new variant of *stx2*.

The stx2-e is associated so much to economic losses in the meat facilities as well as to the development of pathologies in human. In view of these results we cannot discard the pig like a risk agent of illness in human population and that more insight is necessary.

## INTRODUCCIÓN

*Escherichia coli* es un microorganismo que forma parte de la flora anaeróbica facultativa normal del tracto digestivo de animales y humanos; sin embargo, se reconocen 3 patotipos, aquellos que producen infecciones urinarias, los responsables de meningitis/sepsis y los que producen enfermedades entéricas (diarreas). Dentro del patotipo diarreogénico se han clasificado 6 categorías: *E.coli* enterotoxigénica (ECET), *E.coli* enteropatogénica (ECEP); *E.coli* enteroinvasiva (ECEI), *E.coli* enteroagregativa (ECEA<sub>g</sub>), *E. coli* de adherencia difusa (ECAD) y *E. coli* productoras de shigatoxinas (STEC). Dentro de las STEC se describe un subgrupo llamado *E. coli* enterohemorrágica (ECEH), la cual además de sintetizar las toxinas posee el gen *eae*, que codifica para intimina. Este subgrupo ha sido aislado de diferentes animales domésticos y de consumo, y es el único considerado zoonótico. Al respecto, internacionalmente se ha descrito que su principal reservorio es el bovino, pero en Chile existen estudios realizados en el año 99' que indicarían al cerdo como el principal reservorio (69%). En esta especie animal la mayoría de las cepas aisladas fueron No-O157, que en Chile son responsables del 64% de las infecciones reportadas en el ser humano.

La importancia clínica – epidemiológica de STEC en los animales de producción es su participación en la presentación de cuadros inespecíficos de diarreas, pudiendo alcanzar un 100% de morbilidad, con bajas productivas asociadas a una menor ganancia diaria de peso hasta la muerte del animal por deshidratación o por el desarrollo de la enfermedad del edema del cerdo. Además se ha visto que los animales cumplen un rol fundamental como reservorios y diseminadores hacia el medio ambiente. En este sentido el contagio de la población humana se puede producir por: (i) contacto directo del hombre con heces de animales, (ii) persona – persona o (iii) por el consumo de alimentos contaminados mediante contaminación cruzada; la cual es resultado de un inadecuado faenamiento del animal, mal manejo de los manipuladores o fallas en el procesamiento térmico de los alimentos.

Lo anterior, ha llevado a que STEC se considere parte de un importante grupo de patógenos emergentes, involucrados en brotes esporádicos de enfermedades asociadas al consumo de alimentos, lo que le ha valido su incorporación al grupo de enfermedades transmisibles por alimentos (ETA`s). Las ETA`s según la Organización Mundial de la Salud (OMS) representan el principal problema de salud pública en el mundo actual, provocando 630 millones de casos de diarrea con 775.000 muertes anuales.

En los seres humanos, STEC produce una infección que puede ser asintomática o manifestarse con diarrea acuosa, colitis hemorrágica (CH) o la complicación extraintestinal y sistémica llamada Síndrome Hemolítico Urémico (SHU). El SHU es una enfermedad caracterizada por insuficiencia renal aguda, anemia hemolítica y trombocitopenia. Un 2 a 7% de los pacientes con CH evoluciona a SHU. En Chile, es una patología que afecta principalmente a los niños menores de 5 años, con una letalidad que alcanza el 10% y que puede dejar secuelas graves tales como insuficiencia renal crónica e hipertensión arterial en un 30% de los casos. Esta información, sumada al cambio alimenticio de la población durante los últimos 10 años, donde el consumo nacional de carne porcina supero al de carne bovina con una ingesta de 22,5 kilos *per* cápita en el período 2007, ha hecho que cerdos y bovinos sean reconocidos como un riesgo para la salud pública, obligando al Ministerio de Salud de Chile a generar políticas públicas que incorporen a las *E.coli* productoras de Shigatoxinas como agente de vigilancia obligatoria desde el año 2000.

En consideración a los antecedentes parece necesario realizar estudios epidemiológicos referidos a STEC en Chile, caracterizando sus factores de virulencia con técnicas de mayor sensibilidad, aportando información epidemiológica que aclare el rol de los animales de abasto, principalmente el cerdo, como reservorio y fuente de diseminación.

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### Antecedentes Generales

*Escherichia coli* (*E. coli*) es una bacteria predominante en la flora anaeróbica intestinal, tanto de animales como de hombres, existiendo clones altamente adaptados que pueden causar una gran variedad de enfermedades. Se reconocen 3 tipos de síndromes clínicos que resultan de la infección con éstas cepas: infecciones del tracto urinario, meningitis/sepsis y enfermedades entéricas (Nataro y Kaper, 1998).

Las cepas diarreogénicas de *E.coli* responsables de las enfermedades entéricas se han clasificado en seis categorías: *E.coli* enterotoxigénica (ECET), *E.coli* enteropatógena (ECEP), *E. coli* productora de shigatoxinas (STEC), *E.coli* enteroinvasiva (ECEI), *E.coli* enteroagregativa (ECEAgg) y *E. coli* de adherencia difusa (ECAD), lo anterior de acuerdo a sus propiedades de virulencia, interacción con la mucosa intestinal, cuadro clínico, epidemiología y serotipos O: H (Nataro y Kaper, 1998).

En Medicina Veterinaria se reconoce además la existencia de *E. coli* necrotoxigénica, que participa en cuadros intestinales y extraintestinales de diversas especies (Weinstein *et al.*, 1988; Zamora *et al.*, 2000a). Se ha aislado de niños con diarrea aguda y de adultos con cuadros extraintestinales, como también de animales con diarrea, septicemia, abortos y en la necrosis dérmica del conejo (Cherifi *et al.*, 1990).

De las categorías descritas anteriormente la única considerada zoonótica es STEC (Griffin y Tauxe, 1991), de la cual han descrito aproximadamente 450 serotipos (Aidar-Ugrinovich *et al.*, 2007). Más de 100 de éstos han sido asociados de manera esporádica a brotes epidémicos en humanos o casos de diarrea. Los serogrupos más involucrados en estos brotes son: O157, O26, O103, O111, O121 y O145 (Johnson *et al.*, 2006).

## Antecedentes Históricos

El inicio de la descripción de STEC tiene 2 hechos convergentes. En un comienzo fue descrita por Konowalchuk *et al*, (1977) cuando vio que una cepa de *E.coli* aislada desde humanos con diarrea y desde cerdos destetados que sufrían de la enfermedad del edema, sintetizaban una toxina capaz de producir la muerte de células Vero en cultivo celular, por este motivo las llamó *E.coli* productoras de Verotoxinas. Posteriormente, ECEH fue descrita en la década de los 80 en Estados Unidos, luego de las observaciones realizadas por Riley *et al*, (1983), quienes estudiaron un brote de colitis hemorrágica en personas que consumieron hamburguesas en restaurantes de comida rápida y que fue relacionado con *E.coli* O157:H7. Ese mismo año se observó que este serotipo (O157:H7) se relacionaba con casos esporádicos de Síndrome Hemolítico Urémico (SHU). Este síndrome se caracteriza por: anemia hemolítica microangiopática, insuficiencia renal aguda, alteraciones cardiovasculares y complicaciones nerviosas (Griffin y Tauxe, 1991). Estudios posteriores demostraron que estas cepas sintetizaban una toxina que era responsable del efecto citopático sobre células Vero de riñón de mono verde africano (*Cercopithecus aethrops*), y que estaba relacionada con la familia de las Shigatoxinas, por lo que se les llamó *E.coli* Verotoxigénicas o productoras de Shigatoxina - like. Por lo tanto, cepas de *E.coli* capaces de sintetizar este factor de virulencia común se les denominó *E. coli* productoras de Shigatoxinas (STEC). Dentro de las STEC se reconocen dos subgrupos: uno que incluye a las *Escherichia coli* enterohemorrágicas (ECEH), las cuales además de sintetizar las Shigatoxinas poseen el gen *eae*, el responsable de codificar para intimina, uno de los principales factores de virulencia; y otro que agrupa a todas las *E. coli* capaces de sintetizar las toxinas, pero que carecen de este gen (O'Brien y Kaper, 1998).

Desde sus primeros aislamientos (1983) asociados al consumo de hamburguesas, las cepas de STEC se consideran como un agente transmisible por alimentos (ETAs), destacándose como vehículo para su diseminación la carne y subproductos cárneos y en menor proporción alimentos tales como jamón, carne de pavo, sidra casera, salame, leche cruda, yogurt y agua contaminados (Dorn y Angrick, 1991; Nataro y Kaper, 1998).

En países industrializados, las infecciones por STEC se presentan como brotes de gastroenteritis asociados al consumo de alimentos contaminados, principalmente carnes de origen bovino (Nataro y Kaper, 1998).

### **Antecedentes Epidemiológicos**

Numerosos estudios se han realizado para establecer la participación de los animales en la epidemiología del SHU, llegando a la conclusión de que el principal reservorio de STEC lo constituyen los bovinos, en los cuales se han descrito frecuencias de aislamiento del orden del 8 al 21%; y los porcinos donde se ha aislado entre un 7,5% al 69% (Beutin *et al.*, 1995; Borie *et al.*, 1997). También se ha logrado aislar en el contenido intestinal de otros animales, tales como: ovinos (66.6%), caprinos (56.1%), perros (4.8%), gatos (13.8%) y pollos (0.7%) (Griffin y Tauxe, 1991; Beutin *et al.*, 1993; Beutin *et al.*, 1995).

La eliminación de STEC de los animales a las heces es transiente y episódica (Sargeant *et al.*, 2000); puede ser afectada por la dieta, edad, alimentación y niveles de estrés (Jones, 1999). Epidemiológicamente se ha visto que no habría predominio por sexo ni por raza, pero aparentemente se aislaría con mayor frecuencia en bovinos jóvenes (Cobbold y Desmarchelier, 2000). En cerdos no existe información al respecto.

Sumado a su fácil diseminación, la bacteria es capaz de mantenerse en el ambiente por varios meses y permanecer hasta 2 años en el estiércol (Fukushima *et al.*, 1999). La alimentación parece ser importante en el desarrollo de la predominancia de ciertos serotipos, se ha visto que dietas altas en nutrientes y bajas en fibras disminuirían la frecuencia de diseminación de ECEH O157, pero mantendrían la bacteria en el intestino (Ezawa *et al.*, 2004). Al muestrear vacas en pastoreo y vacas en feedlot, se encontró que el serotipo O145:H- sólo se aislaba en los animales que estaban bajo un régimen de feedlot, este serotipo fue aislado posteriormente también desde cuadros clínicos. La explicación a este cambio en la ecología bacteriana se sustenta en la base que los sistemas intensivos de producción utilizan en su alimentación un mayor porcentaje de concentrados como base de

la alimentación, acidificando el pH intestinal; teniendo como consecuencia una transformación en la ecología bacteriana, donde las *E. coli* ácido resistentes aumentan en número (Padola *et al.*, 2002; Padola *et al.*, 2004).

### **Factores de Virulencia.**

Este grupo de enteropatógenos son un ejemplo de bacterias altamente adaptadas que mediante la adquisición horizontal de genes de transferencia han aumentado su competitividad y rendimiento (Garmendia *et al.*, 2005).

Dentro de los factores de virulencia conocidos se puede mencionar (tabla 1):

<b>Gen</b>	<b>Producto</b>	<b>Función</b>	<b>Codificado en</b>
<i>Stx1 y 2</i>	Stx1 Stx2	Disminuir síntesis de proteínas, promueve la respuesta inflamatoria. Altamente relacionado al desarrollo del SHU.	Bacteriófago en el cromosoma bacteriano.
<i>hlyA</i> <i>esp P</i>  <i>saa</i>	HlyA Esp P  Saa	Enterohemolisina Serina proteasa, citotóxica. Factor de adherencia	pO157
<i>eae</i> <i>cap A</i> <i>efa 1</i> <i>ent</i>	Intimina Esp A Efa enterotoxina	Adherencia Adherencia Adherencia	LEE
<i>Iha</i>	Iha	Actividad Proteolítica	Isla Cromosómica Mayor

**Tabla 1.** Tabla resumen de los distintos factores de virulencia.

## **Shigatoxinas.**

Dentro de los factores de virulencia que caracterizan a las cepas STEC está la producción de dos citotoxinas llamadas Shiga-like toxin, Shigatoxinas (Stx) o Verotoxinas 1 y 2, ambas codificadas por genes de bacteriófagos integrados en el cromosoma bacteriano. No presentan inmunidad cruzada entre ellas y una cepa de STEC puede presentar Stx1, Stx2 o ambas toxinas a la vez. La familia de las Shigatoxinas inhibe la síntesis proteica por bloqueo del factor de elongación 1, dependiente de la unión del aminoacil-tRNA a ribosomas (Thorpe *et al.*, 2002).

Esta toxina posee la estructura de las holotoxinas; dos subunidades A centrales (una de ellas con actividad catalítica) y cinco subunidades B periféricas que unen la toxina a su receptor específico globotriosilceramida (GB3) o GB4 en el caso de la variante Stx2-e en cerdos (Nataro y Kaper, 1998).

Estudios de citotoxicidad han demostrado que Stx2 sería más importante que Stx1 en el desarrollo del SHU (Nataro y Kaper, 1998). A pesar de esto Stx2 no tendría un rol fundamental en la colonización intestinal, sino que alteraría la reacción del hospedero frente a la infección promoviendo la infiltración heterófila en el epitelio y lámina propia del colon (Ritchie *et al.*, 2003).

En la actualidad se han descrito tres variantes genéticas para Stx1 y doce para Stx2, algunas de estas variantes son: Stx2c, Stx2d, Stx2e, Stx2f, Stx2g, Stx2v, Stx2vhb, Stx2vha entre otras (Bertin *et al.*, 2001; Leung *et al.*, 2003).

La frecuencia de distribución de las toxinas en el cerdo, muestra un perfil de presentación donde la mayor prevalencia es Stx1-Stx2 con un 68,3%, seguido por Stx2 con un 17,1% y Sxt1 con un 14,6% (Borie *et al.*, 1997).

### **Plásmido de Virulencia.**

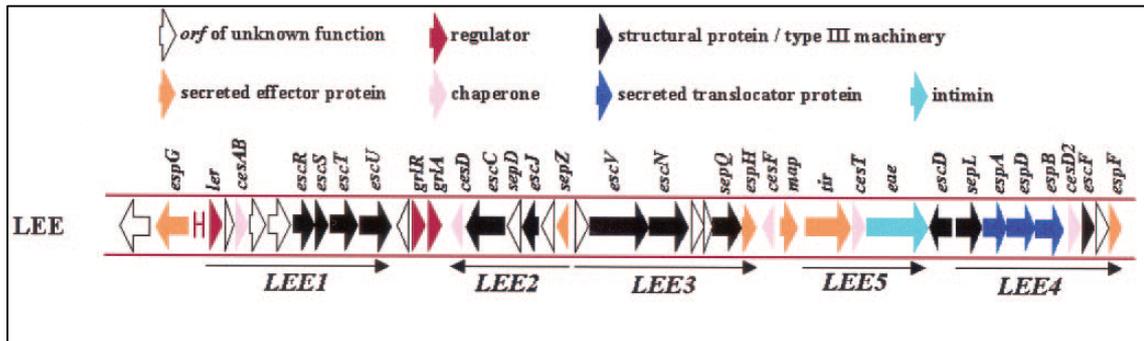
Además de las toxinas, existen otros factores de virulencia importantes, tales como el plásmido de 60 MDa (plásmido pO157), el cual codifica para la **enterohemolisina** (HlyA); toxina que compete por el hierro con los eritrocitos al tener una mayor afinidad (Nataro y Kaper, 1998); **Esp P**, una serina proteasa que es capaz de clivar pepsina y el factor V de coagulación, siendo citotóxica para las células Vero. Se ha sugerido que podría ser la responsable de exacerbar el proceso hemorrágico. También en este plásmido se codifica una proteína que está sólo presente en cepas No-O157, una autoaglutinina (**Saa**) la que hace posible la adherencia en cepas *eae* negativas (Paton *et al.*, 2001).

### **Isla Cromosómica Mayor.**

Recientemente se descubrió otra proteína asociada a la adherencia, llamada **Iha** (*V. cholerae* IrgA-homologue adhesin), la que es codificada por una isla cromosómica de actividad proteolítica adquirida principalmente por las cepas O157:H7 (Tarr *et al.*, 2000), altamente conservada en cepas *intimina* negativas, población que representa un 3% de las STEC (Tatarczak *et al.*, 2005).

### **Isla de Patogenicidad o Locus of Enterocyte Effacement (LEE).**

De manera paralela se ha descrito un elemento genético móvil denominado “locus of enterocyte effacement” (LEE) de 35 kb, que codifica genes involucrados en la adherencia entre la bacteria y la membrana de la célula epitelial (Nataro y Kaper, 1998). La regulación de LEE es compleja y dependiente de las condiciones ambientales, *quórum sensing*, y distintos reguladores, incluido un factor de adherencia “*per*”, llevado en el plásmido y *Ler*, un regulador codificado en LEE en las *E. coli* enteropatógenas (Garmendia *et al.*, 2005).



**Figura 1.** Organización genética del locus LEE en ECEH/ EPEC. (Garmendia *et al.*, 2005).

El locus LEE está compuesto por 5 operones (Figura 1). Recientemente se ha demostrado que su estructura posee una región denominada “core”, la cual es común a todas las islas de patogenicidad LEE. Los operones LEE 1, 2 y 3 codifican el sistema de secreción tipo III y proteínas efectoras (Esp A, Esp B, Esp E y Esp D). El operón LEE 5 codifica para el receptor de intimina translocado (Tir), su chaperona CesT y el gen *eae*, que codifica la proteína de membrana externa llamada intimina, que es responsable de la adhesión a las células epiteliales produciendo las lesiones de esfacelación o lesiones tipo A/E (“attaching and effacing”) en la mucosa intestinal. Investigaciones recientes demuestran que en las *E. coli* enteropatógenas tendrían otro receptor para intimina además de Tir, el cual sería codificado por el hospedero (Hir), lo que se traduciría en una mayor susceptibilidad poblacional (Garmendia *et al.*, 2005; Guirard *et al.*, 2005).

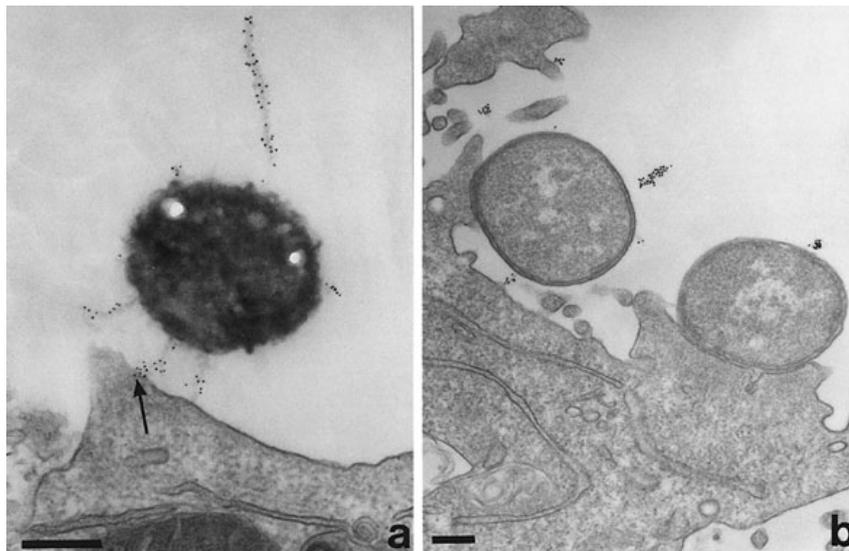
Actualmente se ha descrito un importante número de casos clínicos producidos por cepas STEC intimina negativas (*eae*-), aisladas desde infecciones humanas tan graves como el SHU (O’Brien y Kaper, 1998); esta nueva información hace pensar que existirían otros factores aún no estudiados que participarían tanto en la virulencia como en el desarrollo de la enfermedad; afirmando que cepas intimina negativas igual deben ser consideradas como un peligro potencial para la salud pública.

En cepas capaces de producir lesiones A/E en cerdos sanos y enfermos, se ha visto que el tipo de intimina predominante es la beta (Hongyan *et al*, 2000).

### Genes de Virulencia Presentes en la Isla LEE.

De manera adicional se conocen otros 41 genes codificados en LEE, como por ejemplo *cap A* responsable del filamento *EspA*, importante factor de virulencia relacionado con la adhesión a las células epiteliales (Nataro y Kaper, 1998). Fuera de la región del *core*, en las STEC No-0157 se encuentra el gen *efa1* (ECEH factor for adherence), identificado en un locus genético cromosomal (Nicholls *et al.*, 2000), el cual también estaría relacionado con la adhesión, pero sin producir lesiones A/E en la célula (Jores *et al.*, 2004), y el gen *ent*, que sería un homólogo de la enterotoxina ShET2 de Shigella (Jores *et al.*, 2005).

### Lesiones de adhesión/borrado (attaching/effacing. A/E)



**Foto 1.** En la foto “a” se ven los filamentos Esp A que adhieren la bacteria a la superficie celular. En la foto “b” se ven las lesiones A/E con los pedestales de actina. (The EMBO Journal, 1998. **17**: 2166 – 2176.)

Estas lesiones (Foto 1) se caracterizan por una adherencia íntima de la bacteria al epitelio celular, pérdida de las microvellosidades y acumulación de pedestales de actina (Ritchie *et al.*, 2003); se cree que son las que mediarían la colonización.

Otros factores relacionados a la adherencia son las fimbrias y los lipopolisacáridos (LPS). En ETEC y STEC de cerdos las fimbrias más frecuentemente asociadas a diarreas post destete son la F4 y la F18. Dentro de ésta se han descrito dos variantes: la F18 ab, asociada a la enfermedad del edema del cerdo; y la F18 ac, relacionada a los casos de diarrea. Adicional a F4 (K88) y F18, se ha descrito la F5 (K99), aislada con menor frecuencia de casos de diarrea (Khac Vu *et al.*, 2006).

### **STEC en Cerdos**

Las STEC de cerdos han sido aisladas principalmente de animales con diarreas post destete o con la enfermedad del edema del cerdo. Dentro de estas patologías los serotipos más frecuentes son el O138, O139, O141, O149 y el O157 (Blanco *et al.*, 1997, 2006). Las STEC aisladas desde cerdos muestran un perfil toxigénico donde la variante Sxt2-e es predominante y esta asociada a la enfermedad del edema (Beutin *et al.*, 1995; Nataro y Kaper, 1998). En esta patología se produce daño vascular al endotelio del intestino delgado, subcutáneo y cerebral, llevando finalmente a un edema subcutáneo generalizado y desordenes neurológicos (Khac Vu *et al.*, 2006).

Estudios realizados en Argentina en poblaciones de madres y lechones, muestran que la bacteria no estaría presente en las madres. En el caso de los lechones se aisló la toxina Stx2-e tanto de un grupo con diarrea como de un grupo sin diarrea, pero atrasado en el desarrollo. La vinculación de las cepas Stx2-e con la enfermedad del edema y la merma en el desarrollo de los lechones señalan un riesgo potencial en la sanidad y rentabilidad del establecimiento, además del riesgo para la salud pública. Así mismo, se ha visto que en cerdos todas las cepas pertenecientes a los serogrupos O157:NM, O138:K81 y

O139:K82, capaces de producir la variante Stx2 son negativas a la presencia de *eae*. (Cicuta *et al.*, 2000)

Por otro lado, no se han aislado los diferentes genes de virulencia en cepas productoras de la enfermedad del edema; lo que sí se ha visto es una estrecha relación entre la presencia de *lpfA* y la ausencia de *eae* en cepas positivas a Stx2 (Tatarczak *et al.*, 2005).

### **Variante Stx2-e.**

Es importante considerar que existen reportes donde se ha encontrado esta variante en pacientes con SHU o diarrea (Nataro y Kaper, 1998; Zweifel *et al.*, 2006). Recientemente se ha demostrado que la toxina Stx2-e aislada desde cerdos enfermos y humanos, difiere en sus patrones de virulencia y en su interacción con las células del epitelio intestinal (Sonntang *et al.*, 2005; Zweifel *et al.*, 2006). Cabe mencionar que esta variante de la toxina Stx2 no se ha encontrado asociada directamente al desarrollo del SHU, esto tendría su explicación en varias razones: (i) se ha observado una dificultad para expresar la toxina *in vitro*, sólo un 8,3% de las STEC son capaces de expresar esta variante de la toxina *in vitro*, las razones de esto son aún desconocidas; (ii) la falta de presencia del gen *eae*, el cual parece ser fundamental para la evolución del cuadro hasta SHU, lo que ha hecho que esta variante haya sido menor foco de estudio; (iii) finalmente se ha visto que Stx2-e sólo tiene la habilidad de infectar a adultos, donde la susceptibilidad a desarrollar el Síndrome Hemolítico Urémico es muy baja. Sin embargo, se considera importante mencionar que la bacteria con esta variante de la toxina ha sido aislada en un 20,2% de cuadros diarreicos y en un 26,1% de sujetos asintomáticos. Además se ha aislado STEC O101 productora de Stx2-e desde cerdos sanos y se ha descubierto esta misma cepa desde aislados humanos; estudios posteriores demostraron que estaban relacionadas genéticamente (Franke *et al.*, 1995; Friedrich *et al.*, 2002; Beutin *et al.*, 2004). Esta información no permite descartar a los cerdos como un reservorio potencial de STEC para los humanos, debido a que no se ha podido dilucidar si la variante Stx2-e responsable

de la enfermedad del edema del cerdo, tendría la capacidad de desarrollar patologías en los humanos (Friedrich *et al.*, 2002).

### **Comportamiento Epidemiológico.**

Observando el comportamiento en las poblaciones, se ha observado que el serotipo más prevalente en las patologías causadas por STEC es *E.coli* O157:H7. Sin embargo serogrupos No O157 pueden estar asociados a brotes de intoxicación por alimentos y a casos de SHU (Nataro y Kaper, 1998). Es importante mencionar que un estudio epidemiológico demostró que de 86 niños con SHU, el 64% de los casos había sido provocado por serogrupos No-O157 y el 36% por O157 (Prado *et al.*, 1997).

Dentro de estos serotipos se han visto nuevos elementos de virulencia, como la Isla de Patogenicidad Mayor, muy importante en las cepas O26 (Johnson *et al.*, 2006). Estos nuevos factores de virulencia son de consideración, tomando en cuenta estudios nacionales realizados en cerdos aparentemente sanos (Guerrero, 1999) donde se describe que sólo un 15,9% corresponderían a cepas O157, y el resto (84,1%) corresponderían a serotipos No O157 (encontrándose en un 3,6% O26 y en un 6,1% O111). Las cepas encontradas en estos cerdos fueron en un alto porcentaje (90%) *eae* positivas.

### **Situación en Latino América.**

En América Latina el problema es endémico, siendo los principales países afectados: Argentina, Uruguay y Chile.

En Argentina se observan tasas de colonización de un 44% en bovinos y 52% en cerdos, presentándose 300 - 400 casos de SHU al año en menores de 5 años, pudiendo llegar a tasas de 23 cada 100.000 niños en Buenos Aires (López *et al.*, 1998, Padola *et al.*, 2004).

En Uruguay se registran 5 casos por cada 100.000 niños menores de 5 años (López *et al.*, 1998; Padola *et al.*, 2004). En Brasil, las infecciones en general se restringen a casos esporádicos en niños pequeños, pero sin llegar a diarrea sanguinolenta. Los serotipos más frecuentemente asociados a estos casos han sido O26:H11, O111:NM y O111:H8. Aunque de manera esporádica se ha logrado aislar O157:H7. Descartando estos hallazgos, hay una baja ocurrencia de infecciones en humanos, a pesar de encontrar una alta prevalencia de STEC en los animales y los alimentos. Parece interesante mencionar estudios de clonalidad realizados entre cepas aisladas de pacientes, alimentos argentinos y cepas brasileras, de manera sorprendente se encontró que una cepa aislada desde un trozo de carne en Argentina y un ternero diarreico en Brasil estaban en un 84% relacionadas genéticamente. Esto muestra que el traspaso de cepas entre países pudiera ser posible (Guth *et al.*, 2003).

## **Chile**

En 1990 Bülte *et al* analizaron deposiciones de 75 cerdos sanos, mediante la técnica de hibridación de colonias “Colony Blot”; en sólo 6,6% de los animales se aisló ECEH productora de Stx2. Por otra parte Caprioli *et al* (1993), caracterizaron las cepas de 242 cerdos utilizando la técnica de neutralización de citotoxicidad mediante el uso de antiseros específicos, logrando aislar ECEH en un 7,8%. A nivel nacional son pocos los trabajos que existen de prevalencia de la bacteria tanto en bovinos como en cerdos, ya sea en animales o en sus subproductos.

En el año 97' Borie *et al* describieron altas tasas de aislamiento de STEC en porcinos (69%) y bovinos (34%), pero ambos como portadores asintomáticos. Posteriormente en el país se realizaron estudios que buscaron establecer la importancia de los alimentos cárnicos chilenos e importados de venta libre en Santiago y otras regiones en la diseminación del SHU o su relación en enfermedades gastrointestinales. Para esto se analizaron 213 muestras de carne (157 chilenas y 56 importadas); de éste total un 4.2% (correspondiente a 5 muestras de carne de vacuno, 2 de hamburguesas chilenas y 2 a hamburguesas paraguayas) salieron positivas a la presencia de Shigatoxinas. Estos

resultados indican que la circulación de productos eventualmente contaminados es una realidad (Alexandre *et al.*, 1999).

En este mismo año, Zamora *et al.*; estudió 289 cerditos diarreicos de hasta 40 días de edad, pertenecientes a diferentes criaderos de las zona central y sur de Chile , donde de las 79 cepas aisladas encontró 13 cepas productoras de verotoxinas (4,5%). Concordando con lo encontrado por Borie *et al.*, encontró un predominio del perfil Stx1-Stx2 (5 cepas), Stx1 (5 cepas) y Stx2 (3 cepas). Posteriormente, Zamora *et al.*, (2000b) estudiaron 150 muestras de fecas de cerditos diarreicos menores de 40 días, para detectar la capacidad adherente de las cepas *E. coli* a la línea celular HEp-2, categorizándolas en localizada (LA), difusa (DA) o agregativa (AA). Las cepas aquí estudiadas podrían ser EPEC o VTEC, según la descripción del autor; ya que se ha visto que la capacidad de las *E. coli* LA de producir las lesiones características A/E, pudiendo estar en presencia de EPEC, VTEC o ambas en un 7,3% de las muestras. Este mismo autor estudio 231 cepas de *E. coli* aisladas de un mismo número de cerditos diarreicos menores de 40 días provenientes de diversos planteles, detectando la presencia de verotoxinas en un 6,9% de las muestras (Zamora et al., 2000c).

Existen otras investigaciones nacionales que también describen una alta prevalencia de STEC en cerdos, y de estrecha relación clonal con las cepas aisladas en humanos (Ríos *et al.*, 1999). Paradojalmente, hay pocos estudios que asocien ECEH de cerdos con SHU o que se identifiquen alimentos derivados del cerdo como importante fuente de infección (Ríos *et al.*, 1999).

En nuestro país, a través de una red de vigilancia de brotes de infección gastrointestinal iniciada en 1996 (Sotomayor *et al.*, 2000), que incorporó a ECEH en el 2000, se ha visto que la tasa de incidencia de SHU en la capital es de 3.2 casos por cada 100.000 niños. Constituyendo una importante causa de insuficiencia renal aguda en niños menores de 4 años (Prado *et al.*, 1997). Sin embargo, se piensa que este valor podría estar subestimado, ya que no es una enfermedad de notificación obligatoria, por el uso de

antibióticos previo a la muestra, y porque los laboratorios no incluyen de forma rutinaria la identificación de ECEH en los coprocultivos.

Dado los actuales datos de prevalencia de serotipos de STEC patógenos para el hombre (O157, O26 y O111) aislados desde heces porcinas, sumado al aumento del consumo de carne porcina que en el año 2007 llegó a 22,5 kilos por habitante, hace evidente una realidad preocupante en Chile. Esta situación ha llevado a la necesidad de volver a estudiar a los cerdos como posible reservorio y potencial peligro zoonótico. Para esto el presente estudio utilizará herramientas moleculares más sensibles con el objetivo de obtener resultados que aclaren epidemiológicamente el rol que cumplen las especies de abasto en la salud pública, sumando nueva información respecto al tema en Chile.

## **OBJETIVO GENERAL**

- Determinar la presencia de factores de virulencia diferentes del gen *eae* transportados dentro o fuera de la Isla de Patogenicidad LEE de cepas STEC aisladas desde cerdos aparentemente sanos.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Conocer las frecuencias de distribución de las Shigatoxinas 1 y 2 o ambas, presentes en las cepas de STEC aisladas de cerdos aparentemente sanos.
- Conocer la frecuencia de distribución de factores de virulencia distintos de *eae*, asociados a la Isla Genómica de Patogenicidad LEE.
- Determinar el serogrupo más prevalente dentro de las cepas aisladas de heces porcinas.
- Caracterización de posibles variantes del gen *Stx2*.
- Estudiar la relación clonal de las cepas aisladas desde cerdos aparentemente sanos.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### **Diseño.**

Se realizó un estudio descriptivo para determinar el perfil de presentación de los serogrupos de cepas STEC (O157 y No-O157) en la especie porcina. Además se caracterizó el perfil toxigénico de las cepas aisladas y se determinó la presencia de otros genes de virulencia distintos a intimina como *ent*, *efa1*, *hly<sub>a</sub>*, *lpf*, *saa* e *iha*. También se realizó la caracterización de las variantes de la Shigatoxina 2 (Stx 2).

El estudio fue llevado a cabo en los laboratorios del Programa de Microbiología del Instituto de Ciencias Biomédicas de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, financiado por el Proyecto Fondecyt 1061088. Además se contó con la colaboración del Laboratorio de Referencia de *Escherichia coli* (LREC) de Microbiología y Parasitología de la Universidad de Santiago de Compostela, España.

### **Cepas bacterianas.**

Los protocolos fueron realizados con cepas de STEC recolectadas de heces de cerdos aparentemente sanos. Se utilizó como control negativo la cepa *Escherichia coli* K-12 MG1665 (ATCC 700926) y como control positivo la cepa de *E. coli* productora de Shigatoxina O157:H7 EDL 933.

### **Tamaño Muestral.**

Las muestras fueron recolectadas en forma aleatoria de la sala de evisceración de dos plantas faenadoras de la Región Metropolitana.

Para la obtención de las muestras se incluyeron cerdos aparentemente sanos provenientes de distintos orígenes. Se recurrió a las guías de despacho y el plan de faena diario para tener un claro registro del origen de los animales.

La muestra de heces se obtuvo desde intestino grueso, un poco más arriba de recto (dejando una distancia mínima de 10 cms desde ano) para evitar contaminaciones cruzadas por el escaldado.

La recolección de las muestras se realizó al inicio de cada semana, tomando un número aproximado de 30 muestras. Esta fase se extendió por un período aproximado de 4,5 meses.

Se estudió un total de 507 muestras de cerdos aparentemente sanos. Inicialmente se estimó el número muestral (n) de 385, considerando una prevalencia estimada de STEC en cerdos del 20% (estudios nacionales e internacionales), un nivel de confianza del 95% y un error aceptado del 20%, (Win Episcopo 2.0). Con el número inicial pensado (385) sólo se lograron obtener 29 muestras positivas, lo que se consideró insuficiente para lograr una caracterización representativa, por lo tanto, se decidió aumentar el número total de muestras para acercarse lo más posible a 50 (número internacionalmente adecuado) llegando a recolectar 37 cepas en 507 muestras tomadas.

Las muestras fueron obtenidas con un espaciamiento de muestreo dado por el total de muestras a tomar y los animales faenados por día, minimizando la intencionalidad en la toma de muestras.

### **Condiciones de Cultivo.**

La muestra se transportó el mismo día al laboratorio para ser sembrada en placa de agar McConkey e incubada por 18 a 24 horas a 37°C.

## **I Caracterización de Shigatoxinas e Intimina**

### **a. Identificación de *E. coli*.**

De cada muestra sembrada se seleccionó un máximo de 10 colonias con fenotipo aparente de *E. coli* mediante un asa de cultivo (colonias redondas, rosadas, lactosa positivas). Estas colonias fueron sembradas individualmente en una nueva placa McConkey subdividida en 10 áreas. Estas placas fueron incubadas nuevamente por 18 a 24 hrs a 37°C.

### **b. Obtención del ADN bacteriano para PCR.**

Posteriormente con un “pool” general de las 10 colonias sospechosas, se hizo un lisado por muestra, mediante la adición de 200 µl de agua estéril o buffer TE con 1% de Tritón X100 (Winkler®).

Esta mezcla se hirvió dos veces por 5 minutos a 100°C, para luego ser centrifugada a 8000 rpm por 5 minutos a 16°C. De esta manera los restos celulares fueron precipitados y el ADN molde quedó libre en la fase acuosa. El lisado fue almacenado a 4°C y en caso de ser conservado para una utilización posterior, se mantuvo a –20°C.

El lisado fue sometido a un PCR Múltiple para poder distinguir las diferentes categorías de *E. coli* presentes en la muestra. En el caso de encontrar una muestra positiva para STEC, se procedió a hacer un lisado individual de cada colonia de la placa original para poder identificar cuál de las 10 colonias eran positivas y se debían pasar a cepario.

### **c. PCR Múltiple**

La técnica utilizada es la establecida como protocolo en trabajos con cepas de *E. coli*, desarrollada en el laboratorio de Microbiología del Programa de Microbiología en la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile (Vidal *et al.*, 2005).

El lisado bacteriano se utilizó para la amplificación de los genes que codifican las toxinas Stx1, Stx2 y *eae*. Se utilizaron los partidores descritos en la tabla 2 sintetizados por Invitrogen®. Como control negativo se utilizó la cepa *E. coli* K-12 MG1655 (ATCC 700926), y como control positivo la cepa de *E. coli* productora de Shigatoxina O157:H7 EDL933. El volumen final de reacción fue de 25 µl preparado según el cuadro 1 (anexos). La reacción de amplificación se realizó en un termociclador Bio Rad, utilizando un programa que inicia la desnaturalización del material genético a 94°C por 3 minutos y continua con 35 ciclos de amplificación (1.5 minutos a 94°C, 1.15 minutos a 58°C y 1 minuto a 72°C), al término de los 35 ciclos, queda incubando por 7 minutos a 72°C finalizando el PCR y manteniéndose a 4°C.

El tamaño de los productos esperados de la PCR son: Stx1 una banda de 384 pb, Stx2 una banda de 584 pb y una de 482 pb para *eae*.

**Tabla 2.** Secuencia nucleotídica de los partidores específicos para Shigatoxinas e intimina.

<b>Partidor</b>	<b>Tamaño de Amplificado</b>	<b>Secuencia Nucleotídica (5` -3`)</b>	<b>Referencias</b>
Stx 1	348 pb	<b>Fw:</b> CAGTTAATGTTGTTG CGAACG <b>Rv:</b> CACCAGACAATGTAA CCGCTG	Cebula <i>et al.</i> , 1995.
Stx 2	584 pb	<b>Fw:</b> ATCCTATTCCCGGGA GGTTACG <b>Rv:</b> CGTCATCGTATACA CAGGAGC	Cebula <i>et al.</i> , 1995
Intimina	482 pb	<b>Fw:</b> TCAATGCAGTTCCGT TATCAGTT <b>Rv:</b> GTAAAGTCCGGTACC CCAACCTG	Vidal <i>et al.</i> , 2005
Fw: Primer directo Rv: Primer reverso			

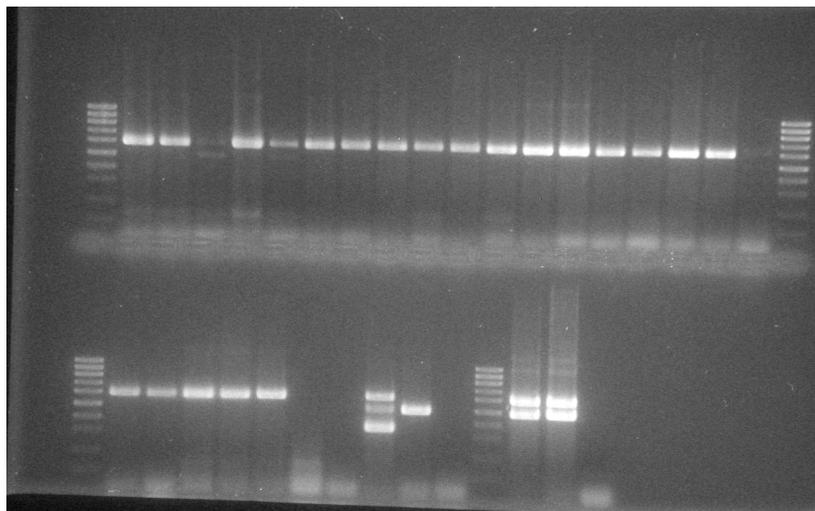
#### **d. Electroforesis y lectura del PCR**

Una vez terminada la amplificación se tomó 10 - 15 µl de muestra del ADN producto de la PCR para someterla a electroforesis en un gel de agarosa al 2% preparado en 75 ml de buffer Tris-Acido Acético EDTA TAE 0.5X (Sigma ®). La muestra fue corrida a 90volts por 45 minutos, utilizando un ADN marcador de tamaño molecular de 100 pb (Invitrogen®). Cada muestra se mezcló con un buffer de carga que contiene Glicerol y Azul de Bromofenol para visualizar la migración (foto 2).

Se observó el resultado de la electroforesis mediante la tinción del gel con Bromuro de Etidio 0.5 ug/ml por 30 minutos y exposición a la luz UV. La imagen fue captada usando el software DigiDoc (Kodak). La visualización y análisis de las imágenes de acuerdo al peso molecular permitió discriminar las *E. coli* positivas a Shigatoxinas (STEC) e intimina.

Se considera importante mencionar que el Bromuro de Etidio se manejó con las normas básicas de bioseguridad, como la utilización de guantes y su inactivación debido al poder cancerígeno que posee. El protocolo utilizado fue dejar la solución de Bromuro de Etidio ya utilizada en un recipiente con carbón activado durante 7 días, posteriormente el líquido fue eliminado y el carbón que ha adsorbido el Bromuro de Etidio es incinerado.

**Foto 2.** PCR múltiple muestras de cerdos de la Región Metropolitana.



**Primera fila:** Carril 1 y 20 marcadores de 100 pb de peso molecular. Carril 2, 3, 5 y 7 a 19 muestras positivas Stx 2. Carril 4 y 6 positivas a Stx 2 y *eae*. **Segunda fila:** Carril 1 y 12 marcadores de 100 pb de peso molecular. Carril 2 al 6 muestras positivas Stx 2. Carril 7 y 8 negativas. Carril 9 control positivo *E. coli* O157:H7 EDL933. Carril 10 control negativo *E. coli* K12 MG1655. Carril 11 control de reacción.

## **II Caracterización de los genes distintos a Intimina (*ent*, *efa1*, *hlya*, *lpf*, *saa* e *iha*).**

Para la caracterización de los genes distintos de intimina se trabajó con ADN bacteriano purificado. Para esto se utilizó el Kit “UltraClean™ Microbial DNA Isolation” de MO BIO Laboratorios, Inc.

### **a. Obtención del ADN bacteriano purificado para PCR.**

Se siguió el protocolo descrito por el “Kit UltraClean™ Microbial DNA Isolation” de MO BIO Laboratorios, Inc. Durante todo el proceso hubo utilización de guantes para evitar posible contaminación de la muestra.

### **b. PCR**

Mediante la misma técnica descrita en el punto 1c se hizo la determinación de otros genes involucrados en la virulencia de las cepas que resultaron positivas a la presencia de Shigatoxinas, utilizando secuencias de partidores específicos para cada uno de los genes (Tabla 3).

El volumen final de reacción para cada mix fue de 25 µl.

Para todos los genes se utilizó como control negativo la cepa *E. coli* K-12 MG1655 (ATCC 700926) y como control positivo la cepa de *E. coli* productora de shigatoxina O157:H7 EDL933. En el caso de los genes *ent* y *efa1* se utilizaron otros dos controles positivos, la cepa de *E. coli* productora de shigatoxina E112 (positiva para ambos genes), una EPEC (E2348/69) y la O157:H7 EDL933 (positiva a *efa 1*). En el caso del gen *saa* se debió utilizar una cepa humana como control positivo, utilizando la cepa E026 disponible en la colección del laboratorio.

La reacción de amplificación se realizó en un termociclador Bio Rad, utilizando un programa que se inicia con la desnaturación del material genético por 3 minutos a 94°C y continua con 30 ciclos de amplificación (1.5 minutos a 94°C, 45 segundos a 60°C y 1.5 minutos a 72°C), al término de los 30 ciclos, se incubo por 7 minutos a 72°C finalizando la PCR y manteniéndose a 4°C.

Para el gen *hlya* se utilizó el programa TIR, el que ocupa una temperatura de alineamiento de 56°C (Vidal *et al.*, 2007). Para los otros genes de virulencia se utilizó el programa SAA, el que utiliza una temperatura de alineamiento de 60°C (de Saint-Pierre *et al.*, 2006).

El tamaño de los productos esperados son de 827 pb para el gen *efa 1*, 607 pb para *ent*, 569 pb para *hlya*, 199 pb para *saa*, 273 pb para *lpf* y 792 pb para *iha* (tabla 3).

**Tabla 3.** Secuencia nucleotídica de los partidores para los genes *ent*, *efa1*, *hlya*, *lpf*, *saa* e *iha*.

Partidor	Tamaño de Amplificación	Secuencia Nucleotídica (5'-3')	Referencia
<i>efa1</i>	827 pb	<b>Fw:</b> AACGCTGCATACAAA AATCATCT <b>Rv:</b> TCCGTATTTCTGTCTTCT GAGGT	de Saint-Pierre <i>et al</i> (2006)
<i>ent</i>	607 pb	<b>Fw:</b> TCATCCCCTCAATTA TTAAGCAA <b>Rv:</b> AAAAGCAACCCAGGAA CATTATT	de Saint-Pierre <i>et al</i> (2006)
<i>hlya</i>	569 pb	<b>Fw:</b> AGCTGCAAGTGCGGG TCTG <b>Rv:</b> TACGGGTTATGCCTG CAAGTTCAC	Vidal <i>et al</i> (2007)

<i>lpf</i>	276 pb	<b>Fw:</b> CCTTGCCTACTGTCC GGTGA <b>Rv:</b> AGCGACCAGGGTATT GCTGT	Vidal <i>et al</i> (2007)
<i>saa</i>	119 pb	<b>Fw:</b> CGTGATGAACAGGCTATTGC <b>Rv:</b> ATGGACATGCCTGTGGCAAC	Paton y Paton (2002)
<i>iha</i>	792 pb	<b>Fw:</b> TGGTACGGGTAAAACCGGAG <b>Rv:</b> CTGCGTACAAGCTCACGACC	Vidal <i>et al</i> (2007)

### III Determinación de los Serogrupos más Prevalentes.

Posterior a la obtención del ADN bacteriano purificado, las cepas que en el análisis por PCR resultaron positivas a Shigatoxinas fueron sometidas a una PCR para discriminar entre cepas O157 y No O157 utilizando el protocolo descrito por Desmarchelier *et al* en el año 1998.

#### **a. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para Detección de *E.coli* O157**

Mediante la misma técnica descrita en el punto 1c se hizo la determinación del serogrupo de las cepas que resultaron positivas a la presencia de Shigatoxinas, utilizando secuencias de partidores específicos para el antígeno O157 (tabla 4). El volumen final de reacción fue de 25 µl. La reacción de amplificación se realizó en un termociclador Bio Rad, utilizando un programa que inicia la desnaturación del material genético a 95°C por 5 minutos y continua con 35 ciclos de amplificación (30 minutos a 94°C, 30 minutos a 66°C y 30 minutos a 72°C), al término de los 35 ciclos, se incubo por 7 minutos a 72°C finalizando el PCR y manteniéndose a 4°. El tamaño del producto de la reacción es de 497 pb. Como control negativo se usó la cepa *E. coli* K-12 MG1655 (ATCC 700926), y se utilizaron dos controles positivos, la cepa de *E. coli* productora de Shigatoxinas E211 (O157:H7), y la O157:H7 EDL933.

**Tabla 4.** Secuencia nucleotídica de los partidores para el polisacárido O157. Desmarchelier *et al.*, 1998. J. Clin. Microbiol.

Partidor	Tamaño de Amplificación	Secuencia Nucleotídica (5`-3`)
O157 AF	497 pb	AAG ATT GCG CTG AAG CCT TTG
AR		CAT TGG CAT CGT GTC GAC AG

## **b. Serotipificación**

Una vez obtenidos los resultados, las cepas No O157 se guardaron en un medio de mantención, para ser enviadas a España (Lugo) al centro de referencia de *E.coli* (LREC) en el departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Veterinaria en la Universidad de Santiago de Compostela; para ser serotipificadas mediante la utilización de antisueros específicos O y H utilizando la metodología descrita por Guinée *et al.*, (1981) y modificada por Blanco *et al.*, 1996.

## **IV Caracterización de las Variantes de la Toxina STX 2.**

Para la caracterización de las variantes de Stx2, se amplificó el gen *stx2* en toda su extensión (960 nucleótidos), productos que fueron enviados a secuenciar a la Unidad de Síntesis y Análisis de Biomoléculas de la Universidad de Chile (CESAT). Los resultados obtenidos fueron comparados con las bases de datos, utilizando los programas Clustal W y Mega 4.0.

## **V Perfiles de PFGE (Pulse Field Gel Electrophoresis).**

Sistema CHEF (Clamped Homogeneous Electric Field) es la técnica de mayor poder discriminatorio y mejor reproducibilidad disponible en la actualidad para determinar relación clonal entre organismos, considerada como el “Gold Standard”. Esta técnica permitió tipificar todas las cepas bacterianas en base a las posibles relaciones clonales existentes entre ellas, utilizando un análisis de macrorestricción con la endonucleasa XbaI (BioLabs®) del genoma completo. La electroforesis en campo pulsado se realizó en un CHEF DRIII CHILER (Bio-Rad) de acuerdo a lo descrito por Bertin *et al.*, (2004).

Primero se realizó la suspensión de las cepas frescas crecidas en TSA, en 2 ml de CSB (100 mM Tris (Winkler®); 100 mM EDTA (Sigma-Aldrich®), pH 8.0). Para lograr una concentración estándar en todos los bloques, se midió la absorbancia a 420 nm en el espectrofotómetro. Se prepararon 400  $\mu$ l de la suspensión a una concentración determinada. Posteriormente, para lograr la liberación del ADN se le añadió a cada tubo 20  $\mu$ l de proteinasa K (a una concentración de 20 mg/ml). Una vez terminado este proceso se le agregó 400  $\mu$ l de agarosa al 1% previamente atemperada a 55°C (se utilizó una agarosa especial para bloques = 0.50 agarosa SeaekemGold Bio-Rad®, 45 ml de TE, 5 ml de SDS al 10%), y se prepararon 2 bloques por muestra, los que se dejaron solidificar.

Posteriormente en tubos de 10 ml, se añadieron 5 ml de buffer de lisis CLB (50 mM Tris; 50 mM EDTA; 1% sarkosyl (Sigma-Aldrich®)) y 25  $\mu$ l de la proteinasa K (20 mg/ml). En esta solución se depositaron los bloques para eliminar posibles impurezas del ADN. Se dejaron incubar por 3 horas a 55°C en agitación.

Una vez terminada la incubación, se retiró el buffer de lisis y se hicieron 2 lavados con 5 ml de agua destilada a 50°C, por 20 minutos en agitación. Después se retiró el agua y se agregaron 5 ml de buffer TE (Winkler®) a 50°C, y se volvió a incubar en las mismas condiciones anteriores. Esto se repitió 3 veces. Al final del tercer lavado, se cambió el buffer y se dejaron los bloques guardados hasta su utilización.

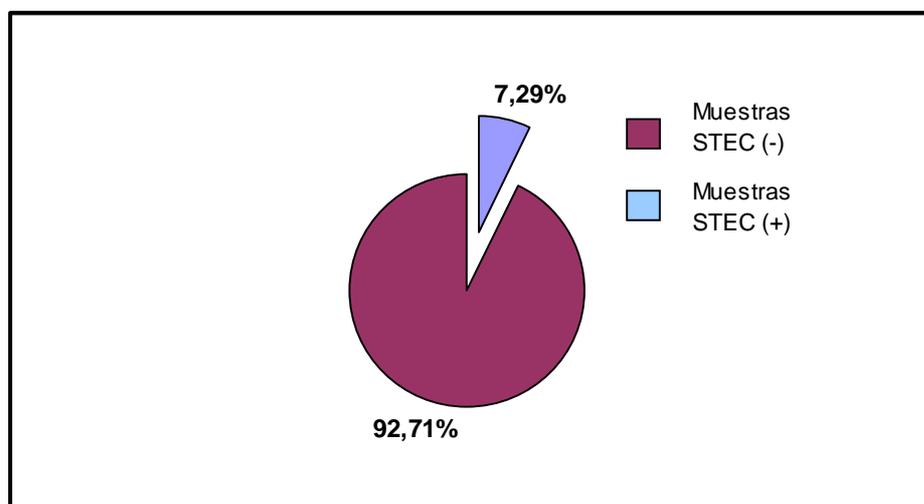
Después se realizó el segundo proceso para el campo pulsado, que consiste en la digestión de los bloques con una enzima (XbaI) de restricción de corte poco frecuente, la cual corta el ADN en fragmentos de 20 a 1100 kb. Para esto los bloques se dejaron incubando por 15 minutos a 37°C; se cortó un trozo del bloque del grosor de un porta y se colocó en el tubo correspondiente con la enzima por 3 horas a 37°C, para evitar digestiones parciales.

Terminada la digestión, se cargaron las muestras en el CHEF bajo condiciones estipuladas para *E. coli*, y se dejaron correr por 18 – 19 horas. Al término se tiñó el gel con Bromuro de Etidio por 20 a 30 minutos en agitación. Se lavó y se dejó en agitación con agua destilada por una hora. Posteriormente se compararon los patrones de corte de las muestras mediante el programa de Tamura *et al.*, (2007), y se realizó el dendograma.

## RESULTADOS

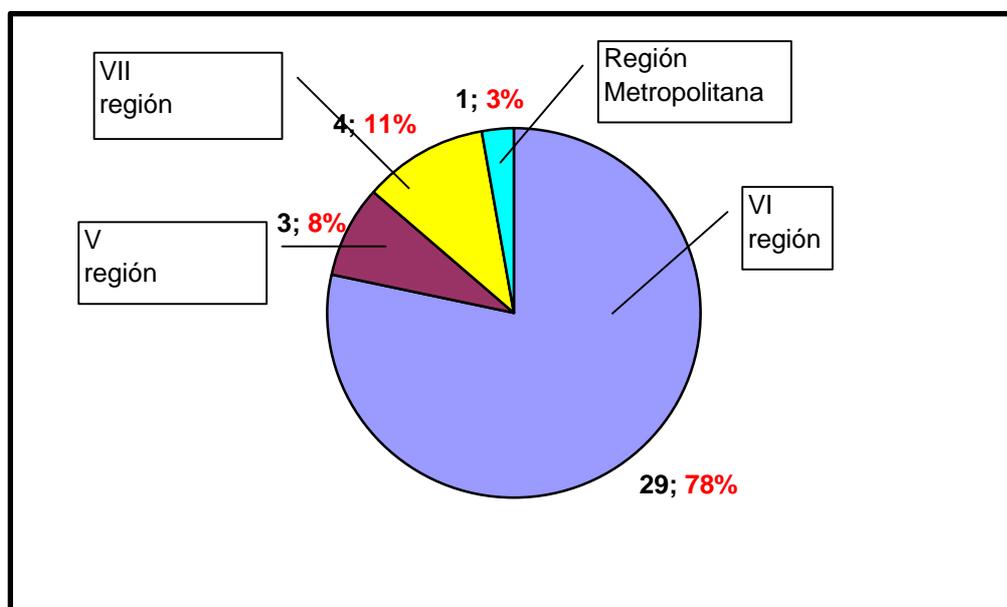
### I Caracterización de Shigatoxinas e Intimina.

Se aislaron cepas de STEC en el contenido intestinal (recto) en 37 muestras de un total de 507 cerdos analizados (Figura 2). En esta especie animal, el genotipo toxigénico predominante de las cepas de STEC aisladas fue Stx 2 (100%). Ninguna de las 37 cepas de origen porcino mostró la presencia del gen intimina (*eae*) responsable de la lesión de adherencia y borrado (A/E) característico de cepas que presentan este factor de virulencia.



**Figura 2.** Porcentaje de aislamiento de cepas de STEC desde muestras de contenido intestinal provenientes de cerdos sanos sacrificados en una Planta Faenadora de la Región Metropolitana, Santiago.

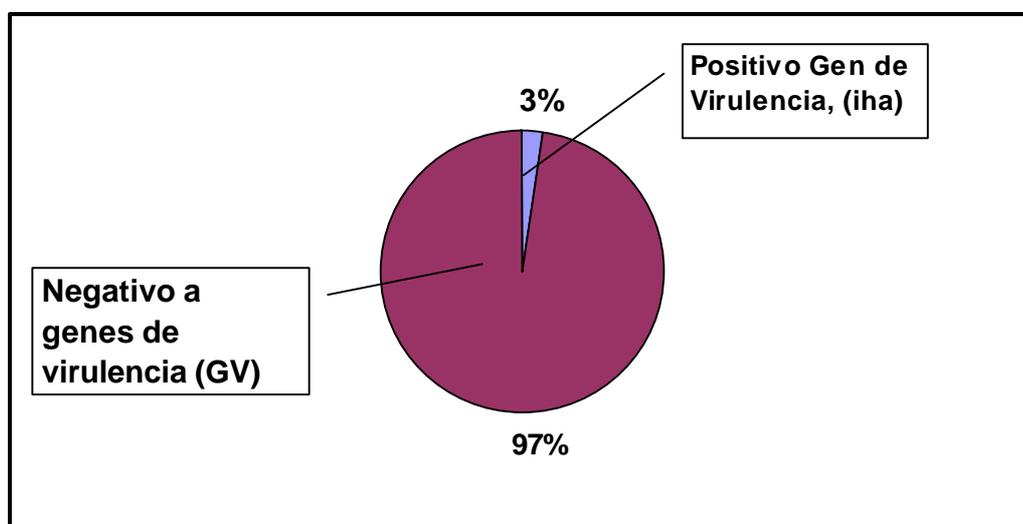
Es importante mencionar que del número total de muestras analizadas, se logró obtener muestras positivas de diferentes lugares geográficos (figura 3), pudiendo incorporar a las principales regiones donde se encuentra centralizada la producción porcina. Se tomaron 238 muestras de la Región Metropolitana (equivalente al 46,94% del total de muestras), 53 muestras de V región (Región de Valparaíso) (10,45%), 161 de la VI región (región de O'Higgins) (31,76%) y 55 de la Región del Maule (10,85%).



**Figura 3.** Número de cepas de STEC aisladas por lugar de procedencia de cerdos sacrificados durante la investigación. El primer número en color negro, corresponde al valor absoluto de cepas de STEC aisladas y el segundo número en rojo expresa el porcentaje respecto del total de muestras positivas.

## II Caracterización de los genes distintos a Intimina (*hlyA*, *iha*, *lpf*, *efa 1*, *ent* y *saa*).

Se encontró que las cepas porcinas en su mayoría no presentan los genes de virulencia caracterizados. Los resultados muestran que ninguna posee la enterohemolisina *hlyA* y el factor de adherencia *lpf*. Tampoco se encontraron cepas que tuvieran el gen de adherencia *saa*. En el caso del gen *iha*, sólo fue observada su presencia en una cepa que correspondió a una STEC O5:H<sup>-</sup> (Figura 4).



**Figura 4.** Resultados expresados en porcentaje de cepas de STEC que presentan Genes de virulencia distintos a Intimina (*hlyA*, *iha*, *lpf*, *efa 1*, *ent* y *saa*).

### III Determinación de los Serogrupos más Prevalentes.

Los resultados arrojados por la PCR específica para O157 muestran que en el caso de la especie porcina el 100% de las cepas de STEC aisladas, fueron No -O157. La identificación de los serogrupos más prevalentes se hizo mediante la utilización de antisueros específicos O y H, en el de centro de referencia de *E.coli* (LREC) en el departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Veterinaria en la Universidad de Santiago de Compostela.

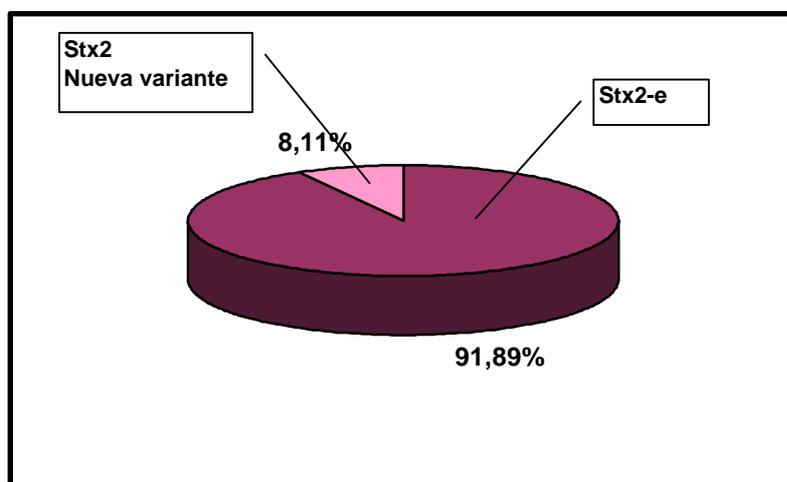
En las cepas aisladas de cerdos, se encontraron los siguientes serogrupos: en 11/37 (29,72%) O141, 6/37 (16,21%) O139, 1/37 (2,7%) O51, 2/37 (5,4%) O8, O20 y O121, 3/37 (8,1%) correspondían a O5 y O159 en cada caso, y 7/37 (18,91%) fueron no tipificables (NT). Los resultados se muestran en la Tabla 5.

**Tabla 5. Serogrupos cepas STEC aisladas de cerdos sanos faenados en un matadero de Santiago.**

Serogrupos	Cepas Porcinas Totales	Porcentaje del total (%)
<b>O141</b>	11	<b>29.72</b>
<b>O139</b>	6	<b>16.21</b>
<b>O51</b>	1	2.7
<b>O8</b>	2	5.4
<b>O20</b>	2	5.4
<b>O5</b>	3	8.1
<b>O159</b>	3	8.1
<b>O121</b>	2	5.4
<b>NT</b>	7	<b>18.91</b>
<b>Cepas Totales</b>	<b>37</b>	

#### IV Caracterización de las variantes del gen *stx2*.

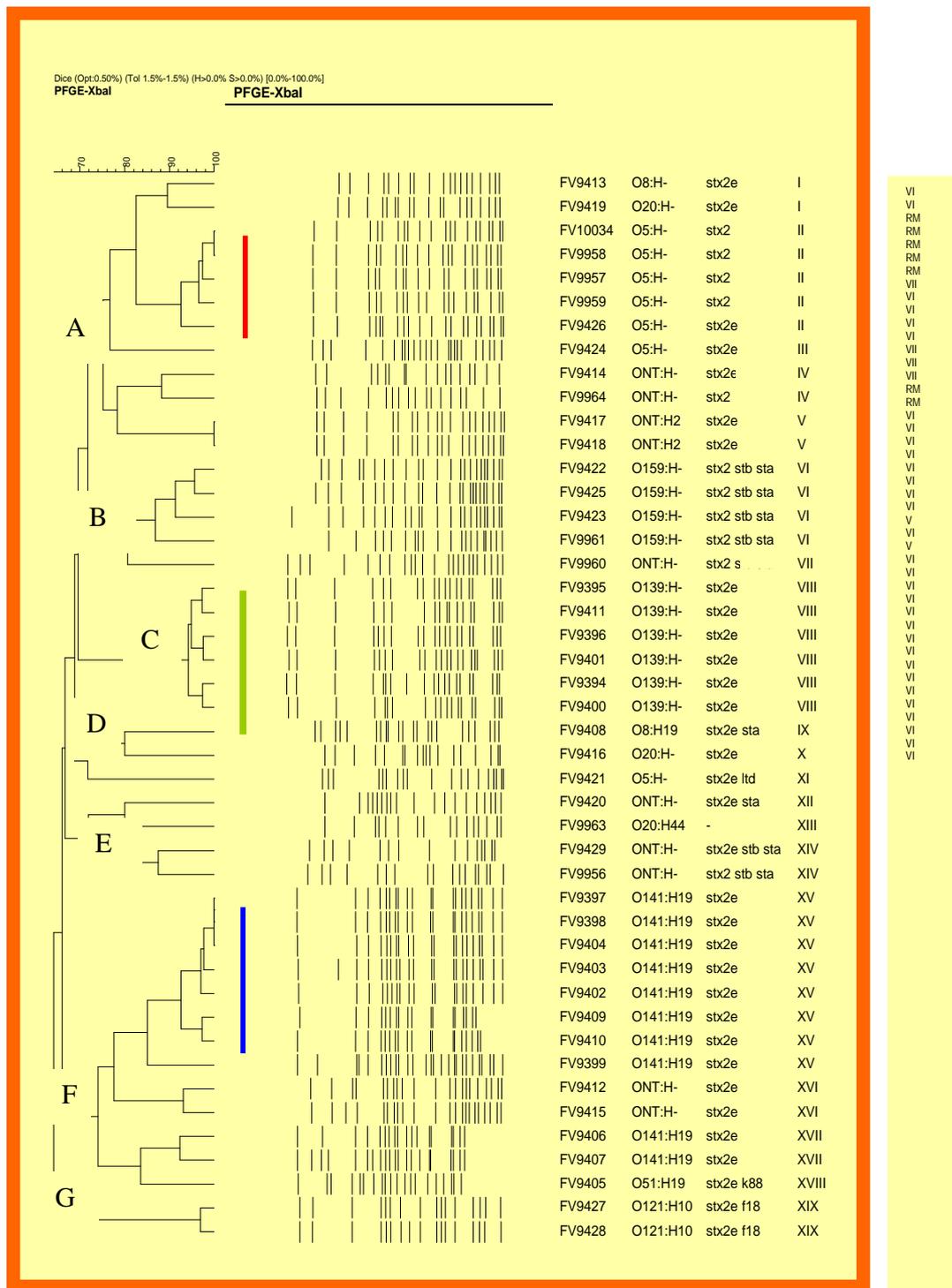
Se encontró que en 34/37 cepas correspondían a la variante *Stx2-e* (figura 5). Los productos de PCR restantes correspondieron a una variante de *Stx2* aún no descrita y que nosotros denominamos *stx2<sub>h</sub>*, presente en cepas de STEC O159:H<sup>-</sup> y relacionadas clonalmente (Figura 6).



**Figura 5.** Caracterización de la variante del gen *stx2* y porcentaje de presencia en las cepas aisladas de STEC provenientes de cerdos sanos.

#### V Campo Pulsado

Las cepas de STEC aisladas de cerdos poseen pulso tipos diferentes con patrones con muy escasa representación (I, III, IV y V). Además, se observan siete grupos de cepas relacionadas genéticamente (A-G). En la sexta región se observa la presencia de tres grupos (A, C y F) de cepas de STEC serotipo O5: H<sup>-</sup> (rojo), O139: H<sup>-</sup> (verde) y O141:H19 (azul), respectivamente, estrechamente relacionadas (clonales).



**Figura 6.** Dendrograma de clonalidad generado a través de electroforesis de campo pulsado para cepas de *Escherichia coli* productoras de Shigatoxina (STEC) aisladas de cerdos para consumo humano. Se adjunta el serotipo y perfil toxigénico de las cepas además del sitio geográfico del cual provenía su reservorio animal.

## DISCUSION

Los resultados obtenidos en este estudio detectaron la presencia de *Escherichia coli* productora de Shigatoxinas en un 7,2% en cerdos aparentemente sanos muestreados desde dos plantas faenadoras de la Región Metropolitana. Este número concuerda con valores referenciales internacionales, donde se ha aislado en un 7,5% (Beutin *et al.*, 1995); existiendo variaciones atribuibles a la individualidad productiva de cada país. Sin embargo, dentro de las STEC aisladas en este trabajo, no se encontró ninguna *Escherichia coli* enterohemorrágica (ECEH), subgrupo que sintetiza las Shigatoxinas y que posee el gen *eae*; el cual codifica para el factor de virulencia intimina, una adhesina altamente asociada al desarrollo de cuadros diarreicos en seres humanos y su posterior complicación sistémica SHU (Nataro y Kaper, 1998; O'Brien y Kaper, 1998).

Es necesario contrastar estos resultados con los obtenidos en estudios anteriores realizados en el país. El único estudio epidemiológico realizado en cerdos destinados a consumo a nivel de planta faenadora, fue hecho por Borie *et al.*, en el año 1997; quien aisló ECEH en un 68,3% de los cerdos muestreados. Este estudio mostró una importante situación de salud pública, ya que más de un 90% de las cepas aisladas poseían el factor de virulencia *eae*, poniendo al cerdo como principal reservorio y diseminador de esta bacteria de riesgo zoonótico. Estos resultados se vieron complementados por el estudio realizado por Ríos *et al.*, en el año 99', donde observó que existía una alta clonalidad entre cepas aisladas desde casos clínicos de pacientes con SHU o diarrea y cepas aisladas desde cerdos. Estudios posteriores en cerditos diarreicos, realizados por Zamora *et al.*, en el año 2000 muestran resultados que se condicen más con publicaciones internacionales, encontrando *E.coli* productoras de verotoxinas entre un 4,3 a 6,9% de los cerdos muestreados.

Esta diferencia de resultados nos hace pensar, que se bien al inicio de su vida productiva los cerditos estaban dentro de rangos normales de colonización de esta bacteria, al crecer se producía una alta recontaminación de los cerdos, alcanzando niveles tan altos como los descritos por Borie *et al.*; al momento de su faenamiento. Actualmente, la nueva situación encontrada en este trabajo se puede explicar en menor medida por las distintas técnicas utilizadas. Además se presume que al interior de los planteles, la prevalencia de la bacteria podría haberse visto afectada por medidas productivas como la crianza en piso elevado, donde se disminuye la probabilidad de recontaminación de los animales con sus propias heces; también son de consideración el uso de prebióticos, los cuales podrían modificar en algún grado la flora bacteriana residente (Sherman *et al.*, 2005). Se suma la introducción de terapias inmunogénicas, como la entregada por la vacuna contra la diarrea neonatal por *E.coli* en lechones. Tomando en cuenta los datos que indican que evolutivamente las STEC habrían evolucionado desde las *E.coli* enteropatógenas (EPEC), principal grupo asociado a las diarreas en los porcinos (Garmendia *et al.*, 2005), se podría pensar que la vacuna podría generar algún grado de inmunidad cruzada. Además se ha aislado *E.coli* en el conducto uterino y vagina de la cerda, por lo tanto, al vacunar a las madres se disminuye la contaminación posterior de los lechones, disminuyendo la probabilidad que nazcan cerditos infectados que posteriormente actúen como diseminadores.

La efectividad de la vacuna se estudió en Argentina (Cicuta *et al.*, 2000) donde se muestreo a las madres y se vio que ninguna era positiva a la bacteria, no así los lechones.

Por otra parte, la disminución de la prevalencia de la bacteria también se vio influenciada por la erradicación de la Peste Porcina en Chile en el año 97', lo que permitió la apertura de las exportaciones, esto hizo que los planteles mejoraran sus condiciones sanitarias buscando cumplir con las altas exigencias de los países importadores. Es por esto que se crearon programas de control sanitario, tales como: el programa de reducción de patógenos para *E.coli* y *Salmonella*, que ha logrado disminuir la contaminación de las canales, además de poder ser un referente de la condición sanitaria de los planteles.

Debido a la apertura de mercados internacionales, la aparición del nuevo cerdo y a condiciones nacionales del mercado, tales como: el déficit de carne bovina (traducido en un alza de precios), el cierre de importantes mercados abastecedores como Brasil (por la presencia de Fiebre Aftosa) y situaciones internas de otros países, se ha creado un nicho sólido para la carne de cerdo, lo que ha hecho que en los últimos diez años la crianza y producción de esta res de abasto haya crecido de manera vertiginosa, se pasaron de 3.050.796 de cabezas faenadas en el año 2000, a las 5.007.035 faenadas el 2007 (Instituto Nacional de Estadísticas). Esta situación se ha visto reflejada en el consumo por habitante en este período (1997 - 2007) el cuál al año 2007 llegó a 22,5 kilos, superando al consumo de carne bovina en el mismo período ([http://www.asprocer.cl/index/plantilla1.asp?id\\_seccion=2&id\\_subsecciones=8](http://www.asprocer.cl/index/plantilla1.asp?id_seccion=2&id_subsecciones=8)).

En respuesta a este “boom” en la carne de cerdo, es que su producción se vio centralizada en algunas pocas grandes empresas, logrando una verticalidad de todo el proceso productivo, lo que se traduce en mejores condiciones higiénicas y tecnológicas finales de la carne. Casi un 50% de su producción se exporta a mercados internacionales, tales como: Japón, Corea del Sur, México, Argentina, Canadá, Alemania entre otros 17 países (<http://www.odepa.gob.cl/odepaweb/jsp/contenidos/internacional.jsp>).

El perfil toxigénico más común de las cepas de STEC aisladas en este trabajo, correspondió en un 100% a Stx2; contrastando fuertemente con los resultados obtenidos en el estudio de referencia del año 97, donde lo más común fue la presencia de ambas toxinas en un 68,3%. Posteriormente, Ríos *et al.*, en su estudio de clonalidad vio que todas las cepas relacionadas a casos de SHU presentaban ambas toxinas y eran *eae* positivas. Los resultados del presente estudio concuerdan con trabajos internacionales que demuestran las cepas porcinas en su mayoría sintetizan Stx2 (Tatarczak *et al.*, 2005). En todo caso, éste cambio en el perfil toxigénico de las cepas en Chile era esperable, ya que el patrón genético encontrado en las cepas clínicas de STEC también ha variado con el tiempo. Esto se ha visto reflejado en los casos de SHU; por ejemplo en el período 1995-96 el perfil toxigénico encontrado en las cepas clínicas era la presentación de ambas toxinas (Stx1 y Stx2) (Prado *et al.*, 1997), en cambio, actualmente la toxina más identificada en pacientes con SHU, es Stx2.

Además se ha visto que estos pacientes son más propensos a desarrollar secuelas sistémicas de SHU (Friedrich *et al.*, 2002).

Esta variación en el perfil toxigénico puede tener varias razones, una posibilidad es que los manejos de las dietas han cambiado. En el caso de los monogástricos los insumos utilizados han variado, esto se puede traducir en un cambio fenotípico de la flora presente, favoreciendo el predominio de ciertos serotipos frente a otros, los cuales sintetizarían en mayor grado un tipo de toxina que la otra (Padola *et al.*, 2002; Padola *et al.*, 2004). Además se ha visto que el tipo Stx1 está más asociado a la producción de diarreas en los lechones, pudiendo alcanzar un 50% de mortalidad, no así el tipo Stx2 el cual se mantendría en el animal sin producir daño, esto contribuiría a que se produzca algún grado de selección natural a favor de los serotipos que producen la toxina Stx2 (Aidar-Ugrinovich *et al.*, 2007; Cicuta *et al.*, 2000; Mainil y Daube, 2005).

En lo relacionado a los factores de virulencia, es conocido que a través del tiempo las poblaciones bacterianas van sufriendo cambios, y que esto se puede traducir tanto en cambios de prevalencia como en el desarrollo de nuevos factores de virulencia. De los resultados obtenidos es importante destacar la ausencia del gen *eae* en un 100% de las cepas aisladas.

Esto plantea la presencia de nuevos factores de virulencia tan importantes como intimina, aún no descritos en esta especie. Internacionalmente se ha visto que los genes de virulencia más aislados son: *toxB*, *lpfA*, *efa1*, *iha* y *saa*. (Tatarczak *et al.*, 2005). Existiendo una estrecha relación entre la ausencia de *eae* y la presencia del factor de adherencia *lpf* en las cepas Stx2-e. Esto no se cumplió en este estudio, ya que si bien el 100% de las cepas son *eae*-, así mismo, ninguna posee este factor de adherencia. Con respecto a los otros genes de virulencia estudiados: *ent*, *efa1*, *hlyA*, *iha* y *saa*, sólo se encontró que una de las cepas era positiva a *iha*. Esto llama la atención ya que este factor de virulencia generalmente se ve asociado a cepas O157:H7 (Tatarczak *et al.*, 2005).

Por otro lado, los resultados muestran que un 100% de los serogrupos encontrados son No-O157; entre los que destacan: O141, O139 y los NT. Se ve que los serogrupos más prevalentes han variado en comparación con el estudio realizado en el año 97, donde principalmente se encontraron los serogrupos O157, O26, O111; de gran importancia para la salud pública. Los serogrupos de las cepas analizadas aquí, como el serogrupos O8 y O139, si bien no son considerados los de mayor riesgo para la salud humana, también han sido aislados desde muestras del Instituto de Salud Pública (ISP) (Comunicación Personal, Roberto Vidal). Además un porcentaje fue no tipificable con los sueros usados, situación que también se repite con muestras del ISP. Esto genera, al menos, la duda de la participación de los cerdos como agentes de transmisión.

Esta información es convergente con estudios realizados en el país donde se ha visto que el 64% de las infecciones por STEC se producen por cepas No-O157 (Prado *et al.*, 1997). Así mismo concuerda con datos de países latinoamericanos como Brasil (Aidar-Ugrinovich *et al.*, 2007) donde se ha visto que la mayoría de las cepas aisladas son No-O157. Parece importante manejar esta información de manera global y contrastarla con la entregada por el ISP (Comunicación personal, Roberto Vidal), que demuestra que si bien en un mayor porcentaje las infecciones son producidas por serogrupos No-O157, aún sigue siendo importante la presencia de los serogrupos O157. Por lo tanto, es válido la inquietud del ingreso de carnes contaminadas al país, principalmente la carne de bovino; ya que a éstas no se les exige pruebas específicas para *E. coli*, sólo controles que garanticen su inocuidad, pero más relacionado a temas de conservación de temperatura ([http://www.sag.gob.cl/pls/portal/docs/page/pg\\_sag\\_biblioteca/bibl\\_importaciones/biblio\\_imp\\_pecuaria/biblio\\_imp\\_pec\\_normas/biblio\\_imp\\_pec\\_normas\\_productos/carnebovina\\_resoluc\\_833-887-5656\\_consolidado.pdf](http://www.sag.gob.cl/pls/portal/docs/page/pg_sag_biblioteca/bibl_importaciones/biblio_imp_pecuaria/biblio_imp_pec_normas/biblio_imp_pec_normas_productos/carnebovina_resoluc_833-887-5656_consolidado.pdf)). Tema de gran relevancia, no sólo por el impacto directo en la salud pública (principalmente por el ingreso de carnes picadas y hamburguesas); sino por la posibilidad de la introducción de nuevos serotipos, hecho comprobado en un estudio realizado en Argentina y Brasil (Guth *et al.*, 2003). Es por esto que se considera necesario realizar mayores estudios respecto al tema, sería interesante muestrear el nivel microbiológico de la carne importada.

Siguiendo la misma línea de investigación, buscando la participación de los cerdos en el desarrollo de patologías humanas, es que se quiso caracterizar las variantes de Stx2. Se encontró que un 97,29% de las cepas aisladas correspondían a la variante Stx2-e. Es importante destacar la dificultad en la amplificación de la variante porcina con los primers universales. Una de las posibles razones de esto, es que dentro de las variantes descritas, se ha visto que Stx2-e y Stx2-f estarían lejanamente relacionadas con las otras variantes y que incluso se podrían codificar en otra parte (Friedrich *et al.*, 2002). Stx2-e tiene un 94% de homología con la subunidad A de Stx2 y un 79% de homología con la subunidad B. En conjunto con la Stx2-f son las más lejanas de entre las variantes. Considerando que los “primers” se diseñan en base a alineamientos de secuencias conocidas, para esto se utilizan las secuencias de las toxinas de las cepas más asociadas a brotes y reportes de SHU. Por lo tanto, es esperable que las tomadas como referencia sean todas genéticamente cercanas. Es por esto que no es de extrañar que los primers diseñados para las toxinas en general no amplifiquen las cepas porcinas, debido a una baja coincidencia por su distancia genética.

De manera adicional se logró aislar la presencia de un nuevo tipo de variante, lo que refleja el dinamismo de las poblaciones bacterianas y la posible diversidad genética de los factores de virulencia de esas nuevas variantes. Si bien no se encontró ninguna de las variantes más asociadas a las infecciones en humanos, a nuestro juicio esto no indica un menor riesgo epidemiológico, ya que debemos considerar la nueva información respecto a la contribución de la variante porcina en el desarrollo de patologías (Franke *et al.*, 2002; Beutin *et al.*, 2004; Sonntang *et al.*, 2005; Zweifel *et al.*, 2006). Si bien en un principio se descartaba la variante porcina (Stx2-e) como de riesgo para la salud pública, su situación epidemiológica ha cambiado. En un principio se vio que Stx2-e aislada desde cerdos sanos no era frecuentemente asociada a enfermedades como SHU o colitis hemorrágica (CH), especialmente cuando genes como intimina y enterohemolisinas no estaban presentes; posteriormente cepas Stx2-e han sido aisladas de pacientes con diarrea y SHU e incluso de individuos asintomáticos (Franke *et al.*, 1995; Friedrich *et al.*, 2002; Beutin *et al.*, 2004). Además se ha demostrado que existen relaciones genéticas entre éstas cepas porcinas y cepas aisladas desde pacientes humanos (Ríos *et al.*, 1999).

Por otra parte es destacable la alta prevalencia de Stx2-e en cerdos sanos. Es por este motivo que se piensa que las *Escherichia coli* productoras de Sxt2-e presentes en los cerdos sanos no serían las mismas que las que producen la enfermedad del edema (Sonntang *et al.*, 2005; Zweifel *et al.*, 2006). Se puede considerar que cerdos sanos portadores de esta variante estarían en constante contacto con la población de manera directa a través de sus manipuladores y de manera indirecta a través de sus productos.

Las cepas Stx2-e que no producen la enfermedad del edema y que aparentemente serían las que se transmitirían a los humanos, tendrían factores de adherencia desconocidos que jugarían un rol importante en la colonización. Mientras no se sepa la exacta contribución de esta variante, la interacción de sus factores de virulencia; además de posibles valores de presentación subestimados debido a su dificultad en el aislamiento y caracterización; hace que los cerdos sanos destinados al consumo no puedan ser excluidos como una fuente potencial de infección de Stx2-e para los seres humanos. (Friedrich *et al.*, 2002).

Al analizar las relaciones clonales de las cepas aquí aisladas se vio que existen distintos pulsotipos, por lo tanto la distribución nacional de las cepas es no clonal; pero existiría cierto patrón dado por las regiones de donde provenga la muestra. Por ejemplo, cepas de la Región Metropolitana, casi todas tienen el pulsotipo II. Esto podría asociarse a condiciones ambientales y productivas similares.

Como resultado de este trabajo hay varias consideraciones a tener presente. Es claro que en cuanto a STEC en cerdos existe una nueva situación epidemiológica, que sugiere que con la utilización de manejos productivos, la emergencia de temas como la trazabilidad y la incorporación del Análisis de Riesgo y Control de Puntos Críticos a la industria alimentaria, es posible disminuir las prevalencias de patógenos de riesgo tanto para la salud animal como para la salud humana. Estos manejos sumados a un adecuado faenamiento y tratamiento de los productos en la cadena alimentaria desde su inicio hasta que llega a la mesa del consumidor, se traducen en una mayor inocuidad de los alimentos.

Es importante destacar que el control de ésta y otras bacterias se debe a un esfuerzo conjunto tanto de los profesionales del área de la salud como de las autoridades. Ya que no sólo es importante hacer un control efectivo de la bacteria al interior de los planteles actuando de manera directa sobre los reservorios; además se deben evitar las contaminaciones cruzadas en las plantas de faenamiento y se debe velar por un adecuado tratamiento del producto a lo largo de la cadena productiva. También es importante la labor educativa hacia la población, ya que se ha visto que un alto grado de los contagios son intradomiciliarios (60%) (Griffin *et al.*, 1991).

La caracterización genética y fenotípica de cepas STEC aisladas en este trabajo, mostraron serogrupos que se condicen con cepas chilenas aisladas desde infecciones en humanos (resultados ISP), lo que confirmaría que los cerdos continuarían siendo un reservorio potencial de cepas patógenas para el hombre. Esta situación debe tenerse en consideración para futuros análisis epidemiológicos, así como también, en cualquier futura estrategia preventiva que se establezca de manera conjunta con las instituciones de salud correspondientes.

Es necesaria una investigación constante para poder realizar una vigilancia epidemiológica adecuada; ya que siempre estarán apareciendo nuevas variantes, se descubrirán nuevos genes de virulencia y nuevas formas de relacionarse de la bacteria con su huésped, lo que puede repercutir en la salud tanto de los animales como de los seres humanos.

## CONCLUSIONES

- Se aisló STEC en un 7,2% desde el contenido intestinal de cerdos aparentemente sanos faenados en dos plantas faenadoras de la Región Metropolitana.
- Las cepas porcinas de STEC aisladas del contenido intestinal se caracterizan por presentar un predominio del perfil toxigénico Stx2, con un alto predominio de la variante Stx2-e.
- Ninguna de las cepas porcinas aisladas presento el gen de virulencia *eae*.
- Se ha logrado caracterizar una nueva variante de Stx2, la que se denominó Stx2h.
- No se logró determinar la presencia de los genes: *ent*, *efa1*, *saa*, *hlya* y *lpf*, en las cepas analizadas, y sólo en una de ellas se encontró el gen *iha*.
- Las cepas de STEC de cerdos portadores, corresponden a algunos de los serogrupos aislados desde cuadros infecciosos en el hombre, tales como el O8 y el O139.
- Dadas las características genéticas y de acuerdo a los serogrupos encontrados, los cerdos aparentemente sanos, faenados en la Región Metropolitana, constituyen un reservorio de STEC para el ser humano.
- Las cepas aquí estudiadas poseen pulsotipos diferentes y, por lo tanto, corresponden a una cepa no clonal de distribución nacional.

## BIBLIOGRAFÍA

**AIDAR-UGRINOVICH, L; BLANCO, J; BLANCO, M; BLANCO J.E; LEOMIL, L; DAHBI, G; MORA, A; ONUMA, D.L; SILVEIRA, W.D; PESTANA DE CASTRO, A.F.** 2007. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) isolated from calves in Sao Paulo, Brasil. *Int. J. Microbiol.* **115**: 297-306.

**ALEXANDRE, M; PIÑONES, C.G; MARTINEZ, C; VASQUEZ, V; FUENTES, D.** 1999. Detección de citotoxinas de *Escherichia coli* enterohemorrágica en productos cárnicos chilenos e importados. *Rev. Chil. Infectol.* **16**(4):277 – 82.

**BERTIN, Y; BOUKHORS, K; LIVRELLI, V; MARTIN, Ch.** 2004. Localization of the insertion site and pathotype determination of the locus of enterocyte effacement of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 61 – 68.

**BERTIN, Y; BOUKHORS, K; PRADEL, V; MARTIN, Ch.** 2001. Stx2 subtyping of shiga-toxin producing *Escherichia coli* isolated from cattle in France: detection of a new subtype and correlation with additional virulence factors. *J. Clin. Microbiol.* **39**: 3060-3065.

**BEUTIN, L; GEIGER, D; STEINBRUCK, H; ZIMMERMANN, S; SCHEUTZ, F.** 1993. Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-like toxin) producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy domestic animals. *J. Clin. Microbiol.* **31** (9): 2483 – 8.

**BEUTIN, L; GLIER, D; ZIMMERMAN, S; KARCH, H.** 1995. Virulence Makers of Shiga-like Toxin Producing *Escherichia coli* Strains Originating from Healthy Domestic Animals of Different Species. *J. Clin. Microbiol.* **33** (3): 631-635.

**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. *J. Clin. Microbiol.* **42**: 1099-1108.

**BLANCO, J.E; BLANCO, M; BLANCO, J; MORA, A; BALAGUER, L; MOURIÑO, M; JUAREZ, A; JANSEN, W.H.** 1996. O serogroups, biotypes, and *eae* genes in *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic and healthy rabbits. *J.Clin. Microbiol.* **34**(12):3101-7.

**BLANCO, M; BLANCO, J. E; GONZALEZ, E. A; MORA, A; JANSEN, W; GOMES, T. A; ZERBINI, L. F; YANO, T; PESTANA DE CASTRO, A; BLANCO, J.** 1997. Genes coding for enterotoxins and verotoxins in porcine *Escherichia coli* strains belonged to different O:K:H serotypes: relationship with toxic phenotypes. *J. Microbiol.* **35**:2958-2963.

**BLANCO, M; LAZO, L; BLANCO, J.E; DAHBI, G; MORA, A; LOPEZ, C; GONZALEZ, E.A; BLANCO, J.** 2006. Serotypes, virulence genes, and PFGE patterns of enteropathogenic *Escherichia coli* isolated from Cuban pigs with diarrhea. *Int. Microbiol.* **9**: 53-60.

**BORIE, C; SANCHEZ, M.L; MONREAL, Z; GUERRERO, P ;MARTINEZ, J; ARELLANO, C; PRADO, V.** 1997. Prevalencia y caracterización de *E. coli* enterohemorrágica en bovinos y cerdos sanos faenados en Santiago, Chile. *Arch. Med. Vet.* **29**:205-212.

**BULTE, M; MONTENEGRO, M.A; HELMUTH, R; TRUMPF, T; REUTER, G.** 1990. Detection of verotoxin-producing *E.coli* (VTEC) in healthy cattle and swine with the DNA-DNA colony hybridization method, *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* **103**: 380 – 384.

**CAPRIOLI, A; NIGRELLI, A; GATTI, R; ZAVANELLA, M; MINELLI, F; DONELLI, G.** 1993. Characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* isolated from pigs and cattle in northern Italy. *Vet. Rec.* **25**(133):232 – 4.

**CEBULA, TA; PAYNE, WL; FENG, P.** 1995. Simultaneous Identification Of Strains Of *Escherichia coli* Serotype O157:H7 And Their Shiga-like Toxin Type By Mismatch Amplification Mutation Assay-Multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* **33** (1): 248-250. Erratum in: *J Clin Microbiol.* 33(4):1048.

**CHERIFI, A; CONTREPOIS, M; PICARD, B; GOULLET, PH; DE RYCCKE, J; FAIRBROTHER, J; BARNOUIN, J.** 1990. Factors and markers of virulence in *Escherichia coli* from human septicemia. *FEMS Microbiol. Lett.* **70**:279-284.

**CICUTA, M.E; PARMA, A.E; VIÑAS, M.R; SANZ, M.E; BOEHRINGER, S.I; ROIBON, W.R; BENITEZ, M.C; BARCELO, M.C; VENA, M.M.** 2000. Factores de Virulencia de *Escherichia coli* aisladas de porcinos en Argentina. *Rev. Vet.* **10** (1 y 2) 11 – 13.

**COBBOLD, R; DESMARCHELIER, P.** 2000. A longitudinal study of Shiga toxigenic *Escherichia coli* (STEC) prevalence in three Australian dairy herds. *Vet. Microbiol.* **71**: 125 – 137.

**DESMARCHELIER, P; BILGE, S; FEGAN, N; MILLS, L; VARY, J; TARR, P.** 1998. A PCR Specific for *Escherichia coli* O157 Based on the *rfb* Locus Encoding O157 Lipopolysaccharide. *J. Clin. Microbiol.* **36** (6)1801-1804.

**DE SAINT-PIERRE, M; SOBARZO, G; PINCHI, M; VALENZUELA, P; VIDAL, R; PRADO, V.** 2006. “Caracterización y Perfil Genético de Factores de Virulencia de *E.coli* productoras de Shigatoxina Aislada de Humanos”, Santiago, Chile. XVIII Congreso Latinoamericano de Microbiología, Pucón, Chile.

**DORN, K; ANGRICK, E.** 1991. Serotype O157:H7. *Escherichia coli* from bovine and meat sources. *J. Clin. Microbiol.* **29**: 1225-1231.

**EZAWA, A; GOCHO, F; SAITOH, M; TAMURA, T; KAWATA, K; TAKAHASHI, T; KIKUCHI, N.** 2004. A Three-Year Study of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 on a Farm in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* **66**(7):779-784.

**FRANKE, S; HARMSSEN, D; CAPRIOLI, A; PIERARA, D; WIELER, L.H; KARCH, H.** 1995. Clonal relatedness of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* O101 strains of human and porcine origin. *J. Clin. Microbiol* **33**: 3174-3178.

**FRIEDRICH, A; BIELASZEWSKA, M; ZHANG, W; PULZ, M; KUCZIUS, T; AMMON, A; KARCH, H.** 2002. *Escherichia coli* Harboring Shiga Toxin 2 Gene Variants: Frequency and Association with Clinical Symptoms. *J. Inf. Dis.* **185**:74 – 84.

**FUKUSHIMA, H; HOSHINA, K; GOMYODA, M.** 1999. Long – term survival of Shiga toxin – producing *Escherichia coli* O26, O111 and O157:H7 in bovine feces. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 5177 – 5181.

**GARMENDIA, J; FRANKEL, G; CREPIN, V.** 2005. Enteropathogenic and Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Infections: Translocation, Translocation, Translocation. *Infect. Immun.* **73** (5) 2573 – 2585.

**GRIFFIN, P.M; TAUXE, R.V.** 1991. The epidemiology of infection caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli* and associated haemolytic uremic syndrome. *Epidemiol. Rev.* **13**: 60-98.

**GUERRERO, R.** 1999. Evaluación del cerdo como reservorio de *Escherichia coli* enterohemorrágica. Tesis Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac Medicina Veterinaria.

**GUINEE, P; JANSEN, H; WADSTROM, T; SELLWOOD, R.** 1981. *Escherichia coli* associated with neonatal diarrhoea in piglets and calves. En: Laboratory diagnosis in neonatal calf and pig diarrhoea: Current Topics in veterinary and animal Science. Eds. Leeww P.W., and Guinee P.A.M. Martinus Nijhoff Publishers. Holanda. **13**:126-162.

**GUIRARD, F; BATISSON, I; FRANKEL, G.M; HAREL, J; FAIRBROTHER J.M.** 2005. Interaction of Enteropathogenic and Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* and Porcine Intestinal Mucosa: Role of Intimin and Tir in Adherence. Infect. Immun. **73** (9) 6005-6016.

**GUTH, B; CHINEN, I; MILIWEBSKY, E; CERQUEIRA, A; CHILLEMI, G; ANDRADE, J; BASCHKIER, A and RIVAS, M.** 2003. Serotypes and Shiga toxin genotypes among *Escherichia coli* isolated from animals and food in Argentina and Brazil. Vet. Microbiol. **92**: 335 – 349.

**HONGYAN, AN; FAIRBROTHER, J; DESAUTELS, C; MABROUK, D; DEZFULIAN, H; HAREL, J.** 2000. Presence of the LEE (locus of enterocyte effacement) in pig attaching and effacing *Escherichia coli* and caracterizacion of *eae*, *espA*, *espB* and *espD* genes of PEPEC (pig EPEC) strain 1390. Microbiol. Pathog. **28** (5): 291 – 300.

**JOHNSON, K; THORPE, C; SEARS, C.** 2006. The Emerging Clinical Importance of Non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. Clin. Infec. Dis **43**: 1587-95.

**JONES, D.L.** 1999. Potencial health risks associated with the resistente of *Escherichia coli* O157:H7 in agricultural environments. Soil USE Manay. **15**: 76 – 83.

**JORES, J; RUMER, L; WIELER, LH.** 2004. Impact of the locus of enterocyte effacement pathogenicity island on the evolution of pathogenic *Escherichia coli*. Inf. J. Med. Microbiol. **294**: 103-113.

**JORES, J; WAGNER, S; RUMER, L; EICHBERG, J; LATURNUS, C; KIRSCH, P; SCHIERACK, P; TSCHIAPE, H; WIELER, LH.** 2005. Description of a 111 kb pathogenicity island encoding various virulence features in the enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) strain RW1374 (O103:H2) and detection of a similar PAI in other EHEC strains of serotype O103:H2. Inf. J. Med. Microbiol. **294**: 417-425.

**KHAC VU, H; HOLODA, E; PILIPCINEC, E; BLANCO, M; BLANCO, J; MORA, A; DAHBI, G; LOPEZ, C; GONZALEZ, E; BLANCO, J.** 2006. Serotypes, virulence genes, and PFGE profiles of *Escherichia coli* isolated from pigs with postweaning diarrhoea in Slovakia. BMC Vet. Res. **20**: 2 – 10.

**KONOWALCHUK, J; SPEIRS, J.I; STAVRIC, S.** 1977. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **18**:775-779.

**LEUNG, P.H; PEIRIS, J.S; ROBINS-BROWN, R.M; BETTELHEIM, K.A; YAM, W.C.** 2003. A newly discovered verotoxin variant, Vt2g, produced by bovine verocytotoxigenic *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:7549-7553.

**LOPEZ, E.L; CONTRINI, M.M; ROSA, M.F.** 1998. Epidemiology of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in South America. **In:** J.B. Kaper and A.D O'Brien (eds) *Escherichia coli* O157:H7 and Other Shiga Toxin-producing *E.coli* strains. Washington: American Society for Microbiology.

**MAINIL, J.G; DAUBE, G.** 2005. Verotoxigenic *Escherichia coli* from animals, humans an foods: who`s who?. *J. App. Microbiol* **98**: 1332-1344.

**NATARO, J; KAPER, J.** 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Reviews* **11** (1): 142-201.

**NICHOLLS, L; GRANT, T.H; ROBINSON-BROWNE, R.M.** 2000. Identification of a novel genetic locus that is required for in vitro adhesion of a clinical isolate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* to epithelial cells. *Mol. Microbiol.* **35**: 275 – 288.

**O'BRIEN, A.D; KAPER, J.** 1998. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: yesterday, today and tomorrow, p 3-11. **In:** *Escherichia coli* O157:H7 and other shiga toxin-producing *E.coli* strains. Edited by James Kaper and Alison O'Brien. American Society for microbiology, Washington, DC.

**PADOLA, N.L; SANZ, M.E; BLANCO, J.E; BLANCO, M; BLANCO, J; ETCHEVERRIA, A; ARROYO, G; ULSERA, M; PARMA, E.** 2004. Serotypes and virulence genes of bovine Shigatoxigenic *Escherichia coli* (STEC) isolated from a feedlot in Argentina. *Vet. Microbiol.* **100**: 3 – 9.

**PADOLA, N.L; SANZ, M.E; LUCHESSI, P.M; BLANCO, J.E; BLANCO, M; ETCHEVERRIA, A.J; ARROYO, G.H; PARMA, A.E.** 2002. First isolation of the enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O145:H- from cattle in feedlot in Argentina. *BMC Microbiol.* **2**: 6 -9.

**PATON, A.W; SRIMANOTE, P; WOODROW, M; PATON, J.C.** 2001. Characterization of Saa, a novel autoagglutinating adhesion produced by locus of enterocyte effacement-negative Shiga-toxigenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans. *Infect. Immun.* **69**:6999 – 7009.

**PATON, A., PATON, J.** 2002. Direct Detection and Characterization of Shiga Toxigenic *Escherichia coli* by Multiplex PCR for *stx1*, *stx2*, *eae*, *ehxA*, and *saa*. J. Clin. Microbiol. **40** (1): 271 – 274.

**PRADO, V; MARTINEZ, J; ARELLANO, C; LEVINE, M.** 1997. Variación temporal de genotipos y serogrupos de *E.coli* enterohemorrágicas aisladas en niños chilenos con infecciones intestinales o síndrome hemolítico urémico. Rev. Med. Chile. **125**: 291-297.

**RILEY, L.W; TEMIS, R.S; HELGERSON, S.D; MCGEE, 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 a rare *Escherichia coli* serotype. New Engl. J. Med. **308**: 681-685.

**RIOS, M; PRADO, V; TRUCKSIS, M; ARELLANO, C; BORIE, C; ALEXANDRE, M; FICA, A; LEVINE, M.** 1999. Clonal Diversity of Chilean Isolates of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* from Patients with Hemolytic-Uremic Syndrome, Asymptomatic Subjects, Animal Reservoirs, and Food Products. J. Clin. Microbiol. **37** (3): 778-781.

**RITCHIE, J; THORPE, C; ROGERS, A; WALDOR, M.** 2003. Critical Roles for *stx2*, *eae*, and *tir* in Enterohemorrhagic *Escherichia coli* -Induced Diarrhea and Intestinal Inflammation in Infant Rabbits. Infect. Immun. **71** (12): 7129 – 7139.

**SARGEANT, J.M; GILLESPIE, J.R; OBERST, R.D; PHEBUS, R.K; HYATT, D.R; BOHRA, L.K; GALLAND, J.C.** 2000. Results of a longitudinal study of the prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 on cow-calf. Am J. Vet. Res. **61**:1375 – 1379.

**SHERMAN, P; JOHNSON-HENRY, K; YEUNG, H; NGO, P; GOULET, J; TOMPKINS, T.** 2005. Probiotics Reduce Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and Enteropathogenic *E. coli* O127:H6- Induced Changes in Polarized T84 Epithelial Cell Monolayers by Reducing Bacterial Adhesion and Cytoskeletal Rearrangements. Infect. Immun. **73** (8): 5183-5188.

**SONNTAG, A.K; BIELASZEWSKA, M; MELLMAN, M; DIERKSEN, N; SCHIERAK, P; WIELER, L.H; SCHMIDT, M.A; KARCH, H.** 2005. Shiga toxin 2e-producing *Escherichia coli* isolated from humans and pigs differ in their virulence profiles and interactions with intestinal epithelial cells. Appl. Environ. Microbiol. **71**: 8855-8863.

**SOTOMAYOR, V; OLIVARES, B; PRAT, M.S.** 2000. Síndrome Hemolítico Urémico y *Escherichia coli*, como agente emergente. El Vigía. Boletín de Vigilancia en Salud Pública de Chile. **3**: 7-10.

**TAMURA, K; DUDLEY, J; NEI, M; KUMAR,S.** 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA). Software version 4.0. Molecular Biology and Evolution 10.1093/molbev/msm092.

**TARR, P.I; BILGE, S.S; VARY Jr. 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. Infect. Immun. **68**: 1400 – 1407.

**TATARCZAK, M; WIECZOREK, K; POSSE, B; OSEK, J.** 2005. Identification of putative adhesin genes in shigatoxigenic *Escherichia coli* isolated from different sources. Vet. Microbiol. **110**: 77-85.

**THORPE, Ch.; RITCHIE, J; ACHESON, D.** 2002. Enterohemorrhagic and Other Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. In: *Escherichia coli* Virulence Mechanisms of a Versatile Pathogen. Edited By Michael S. Donnenberg. Academia Press, San Diego, CA.

**VIDAL, M; KRUGER, E; DURAN, C; LAGOS, R; LEVINE, M; PRADO, V; TORO, C; VIDAL, R.** 2005. Single Multiplex PCR Assay To Identify Simultaneously the Six Categories of Diarrheagenic *Escherichia coli* Associated with Enteric Infections. J. Clin. Microbiol. **43** (10): 5362-5365.

**VIDAL, M.; ESCOBAR, P.; PRADO, V.; HORMAZABAL, J.; VIDAL, R.** 2007. Distribution Of Putative Adhesins In Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STEC) Strains Isolated From Different Sources In Chile. Epidemiol. Infect. **135**: 688–694.

**WEINSTEIN, D.L; JACKSON, M.P; SAMUEL, J.E.** 1988. Cloning and sequencing of a shiga-like toxin II variant and *E.coli* strain responsible for edema disease of swine. J. Bacteriol. **170**: 4223 – 4230.

**ZAMORA, J; REINHARDT, G; POLETTE, M; MACIAS, P.** 1999. Diarrea neonatal porcina. Aislamiento de cepas de *Escherichia coli* toxigénicas productoras de STa, LT y VT. Arch. Med. Vet. **31**: 237-274.

**ZAMORA, J; REINHARDT, G; POLETTE, M; MACIAS, P; GONZALES, I.** 2000a. *Escherichia coli* aislada de cerditos diarreicos. Presunción de cepas productoras del Factor Citotóxico Necrosante (CNF). Arch. Med. Vet. **32**: 75-81.

**ZAMORA, J; REINHARDT, G; POLETTE, M.** 2000b. *Escherichia coli* aislada de fecas de cerditos diarreicos. Patrones de adherencia a células Hep-2. Arch. Med. Vet. **32**: 245-251.

**ZAMORA, J; REINHARDT, G; POLETTE, M; MACIAS, P.** 2000c. Detección rápida en el diagnóstico de *Escherichia coli* toxigénica productoras de LT y VT. Arch. Med. Vet. **32**: 83-87.

**ZWEIFEL, C; SCHMACHER, S; BEUTIN, L; BLANCO, J; STEPHAN, R.** 2006. Virulence profiles of Shiga toxin 2e-producing *Escherichia coli* isolated from healthy pig at slaughter. *Vet. Microbiol.* 117: 328-332.

## ANEXOS

**Cuadro 1 : Componentes Utilizados en un PCR Múltiple tipo.**

<b>Componentes</b>	<b>Cantidad</b>
Buffer para PCR (Invitrogen®)	2,5 µl
Cloruro de Magnesio 50Mm (Invitrogen®)	0,75 µl
Partidor F STX1	0,5 µl
Partidor R STX1	0,5 µl
Partidor F STX2	0,5 µl
Partidor R STX2	0,5 µl
Partidor F <i>eae</i>	0,5 µl
Partidor R <i>eae</i>	0,5 µl
Deoxinucleótido trifosfato (DNTP) 200 um (Invitrogen®)	0,5 µl
Agua estéril desionizada	15,125 µl
Taq	0,125 µl
Muestra (Lisado bacteriano)	3 µl
<b>Total</b>	<b>25 µl</b>

**Cuadro 2. Cepas Positivas STEC de las Muestras de Cerdos Sanos.**

<b>108-1</b>	<b>137-6</b>	<b>169-7</b>	<b>231-3</b>	<b>399-5</b>
<b>125-3</b>	<b>142-1</b>	<b>171-3</b>	<b>232-7</b>	<b>414-1</b>
<b>126-2</b>	<b>150-2</b>	<b>172-4</b>	<b>234-9</b>	<b>454-10</b>
<b>130-1</b>	<b>152-3</b>	<b>206-2</b>	<b>242-8</b>	<b>460-3</b>
<b>133-5</b>	<b>153-9</b>	<b>211-4</b>	<b>363-2</b>	<b>499-7</b>
<b>134-5</b>	<b>159-6</b>	<b>220-6</b>	<b>388-3</b>	
<b>135-4</b>	<b>166-8</b>	<b>225-4</b>	<b>390-1</b>	
<b>136-1</b>	<b>168-1</b>	<b>229-5</b>	<b>394-2</b>	

