



UNIVERSIDAD DE CHILE



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

“DETECCIÓN DE GENES DE VIRULENCIA EN CEPAS DE
Escherichia coli PRODUCTORAS DE SHIGATOXINA AISLADAS
DE BOVINOS”

SOLANGE MACARENA VIVANCO CÉSPEDES

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

PROFESOR GUÍA: DR: ROBERTO VIDAL ALVAREZ

SANTIAGO, CHILE
2011



UNIVERSIDAD DE CHILE



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

“DETECCIÓN DE GENES DE VIRULENCIA EN CEPAS DE *Escherichia coli* PRODUCTORAS DE SHIGATOXINA AISLADAS DE BOVINOS”

SOLANGE MACARENA VIVANCO CÉSPEDES

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

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA : DR. ROBERTO VIDAL A.
PROFESOR CONSEJERO: DR. CONSUELO BORIE P.
PROFESOR CONSEJERO: DR. PEDRO ABALOS P.

SANTIAGO, CHILE
2011

AGRADECIMIENTOS

A mi estimado profesor guía, el Dr. Roberto Vidal, quien no tan solo fue un profesor, sino que también un amigo. Al darme la oportunidad de desarrollar esta tesis en su laboratorio, pude involucrarme en el área de la Microbiología y descubrir el mundo de la Investigación. Gracias por su constante apoyo, por su calidad humana y científica y por la dedicación entregada a esta tesis.

A mis amigos de laboratorio, Patricio y Felipe. Por su compañía diaria y por toda la ayuda entregada con muy buena voluntad cada vez que fue necesario.

A Laura Corvalán, con quien comencé esta aventura fuera de nuestra facultad. Gracias por tu compañía y por todo lo entregado durante el desarrollo de esta tesis.

A mis padres, por impulsarme a seguir en esta carrera. Sin el apoyo de ustedes, no habría sido posible.

A Bert, mi alma gemela. Gracias por estar siempre ahí, de buen humor, apoyándome en lo que fuera, tanto en lo práctico como en lo emocional. Sé que siempre puedo contar contigo.

Y a cada uno que de una u otra manera contribuyeron a que esto fuese posible, muchas gracias.

DEDICATORIA

Esta tesis se la dedico a las tres personas más importantes de mi vida: A mi madre, a mi baby y a mi pequeña bebe.

A mi madre, porque siempre has estado ahí, a mi lado, de manera incondicional. Por creer en mí y por tu eterno amor, te mereces mucho más que la dedicatoria de esta tesis.

A mi amor, Bert, porque siempre celebrar mis logros como si fueran tuyos, y el término de este capítulo lo sientes como propio. Para ti va todo lo que tengo y todo lo que soy.

A mi hija, Maite, porque llegaste a mi vida hace tan solo 4 meses y la llenaste de una manera que nunca pensé que podía existir. Desde aquel día de luz, hija mía, todos mis logros, grandes o pequeños, irán dedicados a ti.

Los amo.

ÍNDICE

<i>RESUMEN</i>	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
<i>SUMMARY</i>	2
<i>INTRODUCCIÓN</i>	4
<i>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</i>	6
<i>OBJETIVOS</i>	26
<i>MATERIAL Y MÉTODOS</i>	27
<i>RESULTADOS</i>	36
<i>DISCUSIÓN</i>	39
<i>CONCLUSIONES</i>	48
<i>BIBLIOGRAFÍA</i>	49

RESUMEN

Escherichia coli productora de Shigatoxinas (STEC) es un patógeno asociado a enfermedades transmitidas por alimentos (ETAS). Es responsable de diversos cuadros intestinales y de manifestaciones clínicas más severas como el síndrome hemolítico urémico (SHU) en niños, pudiendo causar la muerte en algunos casos. Está presente en el tracto digestivo de mamíferos, y se considera una zoonosis por transmitirse desde los animales a las personas. Estudios internacionales describen al bovino como el principal reservorio de esta bacteria, constituyendo la fuente de contagio más importante para los seres humanos. A pesar de lo anterior, un estudio del año 1997 en Chile concluyó que los cerdos son el mayor reservorio de STEC. Por ser un estudio de más de 10 años, y porque además en Chile el consumo de carne bovina alcanzó la cifra de 22,1 kg. per cápita al año durante el 2009, siendo el tercer lugar dentro de las preferencias, se estudió este reservorio en plantas faenadoras de la Región Metropolitana durante el período 2006 y 2007. De 385 muestras obtenidas de heces bovinas, mediante PCR se detectó su presencia en un 11,9%.

Se analizó la frecuencia de distribución de algunos factores de virulencia tales como las Shigatoxina I y Shigatoxina II, la proteína Intimina, y los genes *saa*, *hlyA*, *lpf*, *ent*, *iha* y *efa1*. Los resultados arrojaron una frecuencia de 69,2% para Shigatoxina II, de 9,6% para Shigatoxina I, y de 21,1%, para las muestras que presentaron tanto Shigatoxina I como Shigatoxina II. Para Intimina, fue de un 7,7%. En cuanto a los genes, *saa* fue detectado en el 59,6% de las muestras, *hlyA* en un 67,3%, *lpf* en el 1,9%, *ent* en un 3,8%, *iha* en el 96,1%, y *efa1* en el 5,7%.

Se describen diferentes serogrupos, incluido O157, el cual se asocia a los cuadros clínicos con peor pronóstico. Mediante PCR se caracterizó la frecuencia de aislamiento de *E. coli* O157 (1,9%) y de las no-O157 (98,1%). Las cepas no-O157 fueron clasificadas por aglutinación con antisueros específicos, donde se pudo observar que los serogrupos O171:H2 y O20:H19 son los más frecuentemente aislados. En vista de los resultados podemos concluir que no se puede descartar al bovino como un agente de riesgo para la población humana por ser reservorio de cepas de STEC, incluido el serogrupo O157:H7.

SUMMARY

Shiga toxin producing *Escherichia coli* (STEC) is a pathogen associated with food-borne diseases (ETAs). It is responsible for diverse intestinal manifestations and severe clinical extraintestinal syndrome such as the hemolytic uremic syndrome (HUS) in children less than five years and can cause death in some cases. It is present in the digestive tract of mammals like normal microbiota, and is considered as a zoonosis transmitted from animals to humans. International studies described the cattle as the main reservoir of this bacterium, representing the most important source of infection for humans. In spite of the above-mentioned, a study conducted in Chile on 1997, concluded that swine is the major reservoir of STEC. Considering that this study was done more than 10 years ago and the consumption of beef increased in Chile nearest to 22.1 kg *per capita* per year in 2009, obtaining the third place in the preferences, we proposed to study this reservoir in the Metropolitan slaughtering plants that processed animal from different Chilean region during the period 2006 to 2007. Our results showed that STEC was detected by PCR in 46 from 385 fecal bovine samples corresponding to 11,9%.

We also analyzed by PCR the frequency of the most characteristic virulence genes associated with pathogenic STEC strains in those isolated from bovine, such as shigatoxin I and II, Intimin (*eae*) and other genes encoded putative adhesins, such as *saa*, *hlyA*, *lpf*, *ent*, *iha* and *efa1*. The results showed a frequency of 69,2% for Shigatoxin II, 9,6% for Shigatoxin I, and 21,1% STEC strains harbored both variants of Shigatoxins (I and II). The Intimine protein was detected in 7,7%. Genes encoded putative adhesins were detected in the most of STEC strains with different frequencies, *saa* was detected in 59,6%, *hlyA* in 67,3%, *lpf* in 1,9%, *ent* in 3,8%, *iha* and *efa1* were detected in 96,1% and 5,7%, respectively.

The study described several serogroups, including O157, who normally is associated with worse clinical prognosis. Using PCR, we characterized the frequency of isolation of EHEC O157:H7 (1,9%) and non-O157 (98,1%). Non-O157 STEC strains were classified by agglutination with specific antisera. Those strains showed that the serotypes O171: H2 and O20: H19 were the most frequently isolated. In view of these results, we conclude that cannot rule out the cattle as an agent of risk for humans because to be a reservoir of STEC strains, including serogroup O157: H7.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETAs) están cobrando cada vez más relevancia a nivel epidemiológico por representar un problema nacional creciente en salud pública, dado por su alta incidencia y progresivo aumento en los últimos años. La Organización Mundial de la Salud (OMS), el año 2000, estableció que la inocuidad de los alimentos es una prioridad, lo que fue determinado por la aparición de importantes brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos a nivel mundial.

Un importante agente dentro de las ETAs es *Escherichia coli* productora de shigatoxinas (STEC), bacteria responsable de cuadros gastrointestinales que pueden ir desde una diarrea aguda, colitis hemorrágicas, hasta cuadros tan graves como el síndrome hemolítico urémico (SHU) en niños y púrpura trombocitopénica trombótica en la tercera edad.

Escherichia coli productora de Shigatoxina es un patógeno emergente que fue reconocido por primera vez como patógeno humano en 1982 durante dos brotes de colitis hemorrágica (CH) ocurridos en Estados Unidos, atribuidos al consumo de hamburguesas en un restaurante de una cadena de comida rápida.

Esta bacteria es parte de la microbiota normal intestinal de muchas especies animales, y es la única *E. coli* diarreogénica zoonótica. Los animales que la portan no producen el cuadro clínico que sí se presenta en humanos.

Se describe a nivel internacional que la especie bovina sería el principal reservorio. En Chile existen estudios que describen una realidad diferente donde es la especie porcina la que porta en mayor proporción a esta bacteria. Sin embargo, son los bovinos los que acaparan la mayor atención por ser la fuente de contagio más importante a través del consumo de sus subproductos mal cocidos o crudos. También se debe considerar que el consumo de carne vacuna a nivel nacional en la actualidad alcanza valores del 28%, valor que ha ido disminuyendo en relación a años anteriores pero que de todas maneras implica un alto consumo y debe tomarse en cuenta. De este porcentaje, más de la mitad corresponde a importaciones, las cuales provienen principalmente de países como Brasil y

Argentina, lugares en los cuales la prevalencia de STEC es la descrita a nivel internacional.

A pesar de la disminución en el consumo de carne bovina per cápita a través de los años, de todas formas debe considerarse como una importante vía de transmisión hacia los humanos. Por otro lado, se ha reportado una alta asociación entre las cepas humanas y bovinas, motivo por el cual se ha puesto especial énfasis en su incorporación como agente de vigilancia el año 2000 por parte del Ministerio de Salud.

Por la relación directa entre los bovinos portadores de STEC, la transmisión existente desde sus productos a los humanos, y los graves cuadros clínicos que pueden llegar a desarrollarse principalmente en la población infantil, donde el SHU alcanza valores de 3-4 casos por cada 100.000 niños al año, parece necesario realizar estudios epidemiológicos de STEC, caracterizar su frecuencia de distribución y factores de virulencia considerando al bovino como reservorio y principal fuente de diseminación.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

ANTECEDENTES GENERALES

El Género *Escherichia* pertenece a la familia Enterobacteriaceae y está compuesto por varias especies, dentro de ellas, *Escherichia coli* (*E. coli*). Es una bacteria Gram negativa, anaerobia facultativa, que forma parte de la microbiota normal del intestino del hombre y de los animales de sangre caliente, siendo la más abundante de las bacterias anaerobias facultativas intestinales. Sin embargo, en individuos inmunosuprimidos o en el caso de que las barreras gastrointestinales se vean alteradas, pueden producir algún grado de infección.

Esta bacteria presenta 2 antígenos basados en diferencias estructurales de superficie bacteriana, los cuales nos ayudan a su serotipificación. Estos son:

- 1 Antígeno somático (O), determinado por la porción polisacárida del lipopolisacárido (LPS) presente en la pared bacteriana. En base a este antígeno se realiza la clasificación en diferentes serogrupos.
- 2 Antígeno flagelar (H), de naturaleza proteica y corresponde a flagelos que otorgan movilidad a la bacteria. En base a éstos se determinan diferentes serotipos.

Se reconocen aproximadamente 174 antígenos O y 53 antígenos H, conformando una gran variedad de serogrupos y serotipos hasta la fecha conocidos (Scheutz *et al*, 2004).

La serogrupificación y serotipificación de *E. coli* ha sido fundamental, ya que se ha observado que conjuntos de serogrupos y serotipos están directamente relacionados con diferentes cuadros patológicos y por lo tanto, se ha convertido en una herramienta epidemiológica para el estudio de brotes diarreicos en el hombre (Levine, 1987).

Se distinguen tres grandes grupos de *E. coli* patógenas para el hombre. Un grupo es capaz de producir infecciones en el tracto urinario, el segundo produce sepsis o meningitis neonatales y el tercero es responsable de infecciones gastrointestinales. A éstas últimas se les denomina *E. coli* diarreogénicas, y según el cuadro clínico que producen, propiedades de virulencia, interacción con la mucosa intestinal y epidemiología, se diferencian en las siguientes categorías: (Nataro y Kaper, 1998; Kaper *et al*, 2004).

- 1 *E. coli* enterotoxigénica (ECET)
- 2 *E. coli* enteropatógena (ECEP)
- 3 *E. coli* enterohemorrágica (ECEH)
- 4 *E. coli* enteroinvasiva (ECEI)
- 5 *E. coli* enteroagregativa (ECEAgg)
- 6 *E. coli* de adherencia difusa (ECAD)

De acuerdo al criterio aplicado por Levine, en medicina veterinaria se reconoce la presencia de ECEP, ECET y ECEH en animales enfermos y sanos (Zamora *et al*, 1994; Blanco *et al*, 2001), describiéndose además otra categoría denominada *E. coli* necrotoxigénica (NTEC) que no corresponde a las descritas para el hombre. Estas cepas se caracterizan por poseer un factor citotoxigénico con efecto necrotizante y han sido aisladas en animales sanos, con septicemia y con diarrea. Los serotipos identificados son también muy característicos de esta categoría y no corresponden a los observados en cepas de ECEP, ECET y ECEH (Blanco *et al*, 1993).

También se ha descrito una *Escherichia coli* de aves, denominada “*E. coli* patógenas para aves” (APEC), que es parte de la flora normal intestinal de pavos, patos y aves de corral, y que asociada con otros patógenos tales como micoplasmas y virus puede producir infecciones sistémicas con lesiones y aerosaculitis, pericarditis, perihepatitis, peritonitis y salpingitis (Stordeur *et al*, 2002).

De las cepas diarreogénicas, sólo ECEH es considerada zoonosis, por ser transmitida de los animales al ser humano. Es además responsable de patologías tales como colitis hemorrágica (CH), diarreas acuosas y de otros cuadros más severos como el síndrome hemolítico urémico (SHU), anemia hemolítica y púrpura trombocitopénica trombótica en los humanos (Nataro y Kaper, 1998; Donnenberg, 2005).

EPIDEMIOLOGÍA

La primera vez que se reportó un brote donde el responsable etiológico fue esta bacteria, fue en el año 1983, cuando un grupo de investigadores reportaron dos brotes típicos de patologías gastrointestinales, asociados a la ingestión de hamburguesas mal cocidas en un restaurante de comida rápida, caracterizadas por severos calambres abdominales, diarrea acuosa seguida por una gran diarrea sanguinolenta, y donde la fiebre podía o no estar presente (Ostroff *et al*, 1989; Paton y Paton, 2000).

En ese mismo año, otro estudio demostró, en estas cepas, la síntesis de una toxina que tenía efecto citopático sobre células Vero, línea celular epitelial del riñón que posee receptores para la toxina Shiga, presente en EHEC. El estudio determinó la asociación de casos esporádicos de SHU, con detección de citotoxinas de *E. coli* en muestras fecales. Investigaciones al respecto demostraron más tarde que muchas cepas de *E. coli* aisladas de cuadros diarreicos son capaces de sintetizar citotoxinas de la familia de las Shigatoxinas. Se concluyó que la Shigatoxina era el factor de virulencia común entre CH y SHU, y responsable también del daño a nivel intestinal y renal. Por esta característica en común, a este grupo de *E. coli* se les denominó “*E. coli* productoras de shigatoxina” (STEC), que incluye a ECEH y algunos serotipos que no poseen los factores de virulencia necesarios para causar patogénesis, aunque sí son capaces de producir la shigatoxina (O’Brien y Kaper, 1998; Kaper *et al*, 2004).

Escherichia coli PRODUCTORA DE SHIGATOXINAS (STEC)

EHEC es un subgrupo dentro de STEC, y se diferencian por la presencia del gen *eae*, responsable de codificar un factor de adhesión, que es una proteína de membrana externa, denominada Intimina. Se describe que ECEH son *eae* (+), mientras que STEC pueden o no ser portadoras de este gen (O’Brien y Kaper, 1998).

En el último tiempo, se considera a STEC como la responsable de una de las más importantes enfermedades emergentes en los alimentos, siendo su principal reservorio, a nivel internacional, el ganado bovino. Gyles (2006) considera que el ganado bovino es el

mayor reservorio de un diverso grupo de STEC que infecta a los humanos a través de la contaminación de los alimentos, del agua, así como también a través de contacto directo.

Ésta especie alcanza valores de prevalencia del 8 al 21% en estudios realizados por Beutin *et al* (1993). Hussein (2007) describió un rango para STEC O157 que va desde 0,2 a 27,8% y para no-O157, 2,1% al 70,1% para bovinos en plantas faenadoras. Estos rangos generales a nivel mundial, varían ampliamente y podría ser explicado por la significancia del impacto de factores ambientales, por el manejo en las prácticas de promoción para la disminución de STEC, o por ambas.

En Chile, un estudio realizado en 1997 por Borie *et al*, determinó que la prevalencia de ECEH en bovinos alcanzaba un 28,7%, valor que se aproxima a lo descrito a nivel mundial, pero que no coincide con la tendencia internacional que apunta al bovino como la especie portadora en mayor proporción de esta bacteria. Según este estudio, en Chile son los porcinos quienes alcanzan la mayor prevalencia con un 68,3%. En 1999 otro estudio, realizado también en nuestro país por Ríos *et al*, confirma a la especie porcina como el más importante reservorio para EHEC.

A pesar de ambos estudios, pocos casos se han descrito que asocien a los cerdos con casos de SHU (Beutin *et al*, 1995), o que identifiquen a los productos cárnicos porcinos como una fuente de infección (Paton *et al*, 1996).

También se ha logrado aislar esta bacteria del contenido intestinal de diversos animales, tales como ovinos, caprinos, perros, gatos y pollos (Griffin y Tauxe, 1991; Beutin *et al*, 1993). Resulta importante destacar un estudio realizado en China, donde se inoculó un grupo de caninos con aislados bacterianos O157:H7 y no-O157:H7, provenientes de humanos fallecidos producto del cuadro clínico provocado por STEC. El estudio demostró que aquellos infectados con no-O157:H7 reprodujeron los síntomas característicos de SHU en humanos, y provocó la muerte en todos los ejemplares, mientras que aquellos perros inoculados con O157:H7, a pesar de presentar síntomas como diarrea sanguinolenta, náuseas y vómitos, se recuperaron a los dos días sin haber sido sometidos a tratamiento (Wang *et al*, 2006).

Es importante mencionar que la transmisión persona a persona también se ha documentado (Doyle *et al*, 1997; Johnson *et al*, 1999).

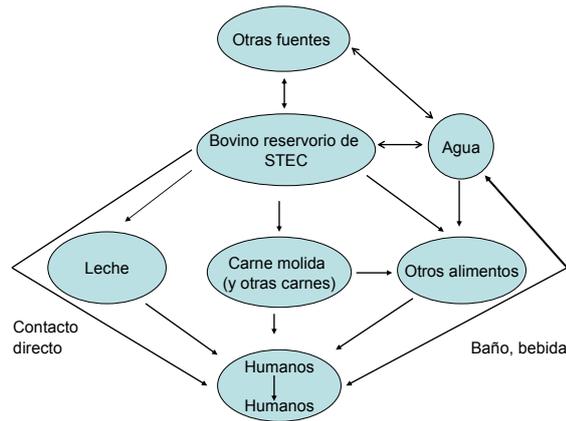


Figura 1. Esquema del rol central del bovino en la transmisión de STEC a humanos. El ganado bovino constituye un gran reservorio de STEC, el cual puede ser transmitido a humanos a través del consumo de carne y leche, contacto directo con los bovinos, consumo de agua o alimentos contaminados con excretas de bovinos, o a través del baño en aguas contaminadas. La carne molida es una frecuente fuente de enfermedad en humanos debido a STEC O157:H7. Las infecciones humanas pueden transferir STEC a otros humanos. (Modificado de “Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: An overview”, de C.L. Gyles, 2006).

O157

En muchos países, STEC O157:H7 y O157:H-, han sido hasta ahora la causa más común de enfermedad en humanos. Estudios realizados en Estados Unidos demostraron que STEC podría estar asociado en el 72% de los casos de SHU. Además, reportó que el serotipo O157:H7 fue el responsable en más del 80% de los pacientes con este síndrome (Banatvala *et al*, 2001). Estudios recientes distinguen a este serotipo como la causa principal de SHU, y es el responsable de grandes brotes a nivel mundial (Michino *et al*, 1999).

Sin embargo, en los últimos años se han distinguido cuadros en humanos asociados a serogrupos no-O157. Existen más de 100 serotipos que comparten una similar y potencial patogenicidad para humanos. Dentro de estos serogrupos implicados en colitis hemorrágicas y SHU, se incluyen el O6, O26, O91, O103, O111, O113, O128, O145 y OX3 (Goldwater y Bettelheim, 1998; WHO, 1998). A pesar de esto, la frecuencia de enfermedad asociada a un serotipo en particular varía según la zona geográfica. En América del Norte, Japón y Europa es común el serogrupo O157, mientras que en América del Sur, es más frecuente encontrar cepas no-O157. En nuestro país se determinó

que sobre un 50% de cepas de STEC aisladas de niños con SHU y diarrea con sangre, corresponden al serogrupo no-O157 (Prado *et al*, 2008).

CUADRO CLINICO DE STEC EN HUMANOS

STEC, patógeno zoonótico emergente, es responsable de un amplio espectro de enfermedades que van desde diarreas moderadas a cuadros graves tales como colitis hemorrágicas y el síndrome hemolítico urémico (Nataro y Kaper, 1998; Kaper *et al*, 2004).

La infección con *E. coli* puede presentarse con un amplio espectro de manifestaciones clínicas, incluyendo severos calambres abdominales con o sin fiebre, o diarrea acuosa que frecuentemente progresa a una gran diarrea sanguinolenta (Griffin *et al*, 1988). También se puede presentar de manera asintomática o solamente con una diarrea no sanguinolenta (Duncan *et al*, 1986). Síntomas extraintestinales, como signos cardíacos y neurológicos, también han sido reportados (Hamano *et al*, 1993). La colitis hemorrágica puede ser la única manifestación de esta infección, o podría anunciar el desarrollo de un síndrome hemolítico urémico (Edelman *et al*, 1988). Como se ha mencionado, además de estar asociada al síndrome hemolítico urémico, también puede producir púrpura trombocitopénica trombótica (Ostroff *et al*, 1989; Paton y Paton 2000; Donnenberg 2005).

Escherichia coli O157:H7 ha sido implicada como un agente etiológico importante en SHU, y es el patógeno que más se aísla en pacientes con esta condición (Scotland *et al*, 1988). Considerando diferentes estudios y el hecho que algunas personas no presentan diarrea sanguinolenta, la verdadera tasa de progresión a SHU de *E. coli* O157:H7 se estima entre un 2 a un 7% (Griffin y Tauxe, 1991).

SHU se desarrolla abruptamente dentro de los 5 a 10 días después de la diarrea en los brotes (Griffin *et al*, 1988), pero el tiempo entre el inicio de la diarrea y el diagnóstico de SHU varía entre 6,5 a 7,7 días (Tarr *et al*, 1990). El desarrollo selectivo de SHU entre pacientes infectados con *E. coli* O157:H7 podría estar asociado a factores como la susceptibilidad del hospedero, inmunidad preexistente, dosis infectante, virulencia de la cepa, o de otros factores desconocidos (Belongia *et al*, 1991).

Por otro lado, púrpura trombocitopénica trombótica es un cuadro grave con signos tales como trombocitopenia, anemia hemolítica angiopática, fiebre, falla renal y síntomas neurológicos. Se pensó en púrpura trombocitopénica trombótica como una forma de representar a SHU pero con un espectro de enfermedades vasculares más extensas que este síndrome (Kaplan y Proesmans, 1987), y el criterio para el diagnóstico es el mismo que para SHU, con la adición de fiebre y de déficit neurológico. Muchos agentes o condiciones, que incluyen drogas, toxinas, agentes infecciosos, gestación, y enfermedades inmunológicas subyacentes, han sido implicadas como causas de púrpura trombocitopénica trombótica (Ridolfi y Bell, 1981).

La púrpura trombocitopénica trombótica asociada a *E. coli* O157:H7 se ha reportado en algunos casos (Kovacs *et al*, 1990), y su presentación ha servido para reconocer brotes de *E. coli* O157:H7. Sin embargo, esta progresión ocurre, como mucho, en el 8% de los pacientes con colitis hemorrágica asociada a *E. coli* O157:H7 (Ostroff *et al*, 1989).

Los pacientes con SHU que fallecen de diarrea presentan, generalmente, varios días una diarrea aguda y severa, y el paciente se va deteriorando rápidamente. La falla renal persiste cuando la diarrea cesa, y el volumen urinario disminuye. Estos pacientes generalmente mueren dentro de los 5 a 14 días después del inicio de la diarrea (Zhang *et al*, 2002). Cimolai *et al*, en 1994, describieron que cuando la enfermedad es provocada por la cepa O157:H7, existe una mayor posibilidad de que el cuadro progrese a SHU.

SHU EN CHILE

El SHU, caracterizado por una insuficiencia renal aguda, anemia hemolítica microangiopática y trombocitopenia (Cordero *et al*, 1984), es la causa más común en Chile y en el mundo de insuficiencia renal aguda en niños menores de 4 años. De estos niños afectados, una parte importante, alrededor de un 3 a un 5%, muere debido a esta enfermedad (Cerdeira *et al*, 1984; Loirat *et al*, 1984).

En niños chilenos, STEC es el agente causal principal de SHU, con tasas de incidencia que varían entre los 3 a 4,2 casos cada 100.000 niños menores a los 4 años de edad (Cordovéz *et al*, 1992; Vizcaya *et al*, 1996). Esta tasa de aislamiento es similar a las

tasas encontradas en pacientes con el mismo síndrome en Norteamérica, Reino Unido y Alemania.

STEC EN CHILE Y EN EL CONO SUR

La mayoría de los brotes humanos, y casos esporádicos de CH y SHU han sido reportados en países industrializados del hemisferio norte, pero la ocurrencia en algunos países del hemisferio Sur, como Argentina, Australia, Chile y África del Sur también se ha descrito (Nataro y Kaper, 1998).

La enfermedad es endémica con picos en el verano (Prado *et al*, 2008). Este mismo estudio dice que entre el 2002 y el 2004 se notificó una tasa de incidencia de 3,4 casos de SHU por cada 100.000 niños en 14 centros centinelas del país, con una mayor incidencia entre los 6 a 28 meses de edad.

Según López *et al*, en un estudio realizado en el año 1989, la incidencia anual en Oregon, Estados Unidos, fue de 2,6/100000, de 3/100000 en Washington, 3-4/100000 en Canadá, 4,2/100000 en Chile, y de 5/100000 en Uruguay.

En Argentina, en el año 2004, un estudio realizado por Padola *et al*, arrojó una prevalencia de 62,7% para STEC en bovinos. Cabe considerar que este país es el que tiene la más alta tasa de casos de SHU por año (300-400 casos, siendo en Buenos Aires de 22 casos/100.000 niños/año), y el SHU se considera endémico. Presenta también el más alto consumo de carne bovina per cápita anual (60 kg/pércapita/año). Hay que recordar que este país se caracteriza por ser productor de ganado bovino, por lo que estas grandes cifras concuerdan con su cartel de país ganadero. *Escherichia coli* O157:H7 se encuentra en la mayor parte de los casos de SHU en Norteamérica, pero en estudios realizados en niños en Argentina, donde la incidencia de este síndrome está dentro de las más altas del mundo, y donde el consumo de carne es casi universal, investigadores aislaron *E. coli* O157:H7 en sólo en 2% de los casos con SHU, y en un 48% de estos niños había evidencia de heces libres de toxina. Esto sugiere que no sólo *E. coli* O157:H7 es importante como agente causal del SHU en Argentina (López *et al*, 1989), sino que también representa un riesgo en otros países de Sudamérica.

En Brasil, por el contrario, y a pesar de la cercanía geográfica con Argentina, las infecciones con STEC se restringen a esporádicos casos de diarrea no sanguinolenta, especialmente en niños. A pesar que se han identificado recientemente cepas O157:H7 (Iriño *et al*, 2000), los serotipos que más se asociaron con estas infecciones fueron O26:H11, O111:NM y O111:H8 (Giraldi *et al*, 1990; Iriño *et al*, 2000; Guth *et al*, 2002a). Un caso de SHU se registró asociado a STEC O26:H11 el año 2002 (Guth *et al*, 2002a). Sin embargo, esta aparente baja tasa de presentación de infecciones en humanos, se contrapone con la alta prevalencia de cepas STEC en animales y alimentos en este país.

Un estudio realizado por Guth *et al* (2002b), identificaron a los serotipos O82:H8 y O113:H21 en terneros y carne molida. Según este estudio, Argentina presenta el mismo perfil toxigénico que Chile. En Brasil, StxI o asociada a StxII fue lo más común. También se vio que O157:H7 fue mayormente detectado en animales y alimentos en Argentina, en un 40,9%, contrastando con lo que ocurre en Brasil, donde las pocas cepas de STEC que se encontraron fueron en el reservorio animal.

MECANISMO DE PATOGENICIDAD

La patogenia de STEC no es solamente a través de la producción de Shigatoxinas, sino que también puede producir otros factores de virulencia que pueden incrementar la severidad del cuadro clínico en humanos (Paton y Paton, 2002). Estos factores incluyen Intimina (codificada por el gen cromosomal *eae*, presente en el locus LEE), proteína responsable de las lesiones en la mucosa intestinal conocidas como de “esfacelación y borrado” (A/E para “attaching and effacing”) (Kaper *et al*, 2004), y también una hemolisina enterohemorrágica (codificada por el gen enterohemolisina *Hly*, ubicado en un plásmido de 60 MD), ésta última responsable del daño que se produce en el enterocito (Donnenberg, 2005). En este mismo plásmido también se codifica para una proteína autoaglutinante (Saa), la cual hace posible la adherencia a las cepas que son *eae* negativas (Patton *et al*, 2001).

Tatarczak *et al* (2005) también describieron la presencia de otros genes que codificarían para otras adhesinas putativas, tales como *lpf*, *saa*, *efal* e *iha*.

FACTORES DE VIRULENCIA

TOXINAS

Shigatoxinas

El principal factor de virulencia implicado en la patogénesis de STEC en humanos es la producción de dos toxinas específicas que poseen acción citotóxica sobre células Hela y Vero, por lo que han sido denominadas Verotoxinas (VT). Este hecho explica que a esta categoría también se le conozca como *Escherichia coli* verotoxigénica (VTEC), denominación frecuente en cepas de origen animal (Karmali, 1989). También se las conoce como toxina “Shiga Like” (SLT), debido a la similitud biológica e inmunogénica con la toxina de *Shigella dysenteriae* tipo 1.

La elaboración de las shigatoxinas está mediada por la presencia de genes de bacteriófagos integrados al cromosoma bacteriano (Griffin y Tauxe, 1991). Dentro de éstas, se distinguen a la Shigatoxina I (o StxI) y Shigatoxina II (o StxII). Se han descrito tres variantes genéticas para StxI y doce para StxII, algunas de estas variantes son: Stx2c, Stx2d, Stx2e, Stx2f, Stx2g, Stx2v, Stx2vhb, Stx2vha, entre otras (Bertin *et al*, 2001; Leung *et al*, 2003).

La toxina “Shiga Like” I está compuesta por dos estructuras: la subunidad A formada por un polipéptido y la subunidad B compuesta por cinco polipéptidos idénticos. La subunidad B une la toxina al glicolípidio de membrana (Gb3), y una vez unida a su receptor, la subunidad A se incorpora a la célula por pinocitosis, siendo capaz de resistir la acción de lisosomas y reduciéndose a un fragmento denominado A1. Su acción directa consiste en inhibir irreversiblemente la síntesis proteica causando la muerte celular (Riley *et al*, 1983; Griffin y Tauxe, 1991; Lingwood, 1996).

Debido a que la composición aminoacídica de Shigatoxina I es similar a la de *Shigella dysenteriae* tipo 1, puede ser neutralizada con suero antitoxina de *Shigella*

elaborado en conejo. La actividad biológica, además, es similar en ambas toxinas produciendo toxicidad en células Hela y Vero, actividad enterotóxica en asa intestinal de conejo y toxicidad, parálisis y muerte en ratones (Riley, 1983; Griffin y Tauxe, 1991).

La toxina “Shiga Like II” presenta una estructura molecular parecida a StxI, compartiendo el mismo receptor en células blanco y presentando el mismo mecanismo de acción. Su constitución aminoacídica equivale en un 85% a StxI, por lo que la respuesta inmunológica es diferente. En cuanto a su actividad biológica, StxII es menos tóxica que StxI para células Vero, no tiene acción en células Hela, es más tóxica en ratones, y produce colitis hemorrágica en conejos adultos (Riley *et al*, 1983; Griffin y Tauxe, 1991).

Esta bacteria secreta la toxina que se une a receptores celulares compuestos por glicolípidos (globotriosilceramida, Gb3), presentes en las células epiteliales y tubulares renales, las células miocárdicas, las neuronas de las raíces ganglionares dorsales, las células del sistema nervioso autónomo y las células endoteliales, periteliales y de músculo liso del sistema vascular. En la corteza del riñón humano, el principal sitio de lesión renal en el SHU, se han descubierto altos niveles de Gb3 (Nataro y Kaper, 1998; Lingwood, 1996).

Los portadores pueden presentar ambas toxinas o sólo una de ellas, y en bovinos se ha demostrado que existe una mayor proporción de StxI (72,5%), seguido de StxII (15%), y tan sólo el 12,5% de los bovinos posee ambas toxinas (Borie *et al*, 1997).

Epidemiológicamente, la StxII es la que aparece más ligada a casos severos de SHU en relación a StxI, y las cepas que con más frecuencia se asocian a enfermedades en humanos sólo llevan el gen StxII. Además, según algunos estudios, la StxII es 1000 veces más tóxica que la StxI (Nataro y Kaper, 1998; Schmidt, 2001).

Locus LEE

Otro factor de virulencia está dado por la presencia de una región en el cromosoma bacteriano conocida como LEE (“locus of enterocyte effacement”), que es una isla de patogenicidad con un tamaño de 35 kb (Figura 2). Esta región está conformada por 5 operones, de éstos, LEE1, LEE2 y LEE3 codifican para un sistema de secreción de tipo III

(TTSS); LEE4 codifica para las proteínas EspA, EspB y EspC, que son las proteínas encargadas de alterar las vías de transducción de señales en el hospedero, y LEE5 u operón *tir*, el que codifica el receptor traslocado de intimina (Tir), junto con su chaperona CesT más la proteína Intimina, la cual es responsable de la adhesión de STEC a las células epiteliales del intestino (Elliot *et al*, 1998; Nataro y Kaper, 1998). Mediante el sistema de secreción tipo III, Tir es inyectado dentro de la célula hospedera, actuando como receptor para Intimina, y es cuando se producen las típicas lesiones de A/E en la mucosa intestinal, lesiones de adhesión y borrado (“attaching and effacing”) (Jerse *et al*, 1990). La Intimina es producida por la mayoría de las cepas STEC y por otros enteropatógenos que causan la lesión A/E, tales como ECEP, *Hafnia Alvei* y *Citrobacter rodentium* (Kaper *et al*, 2004).

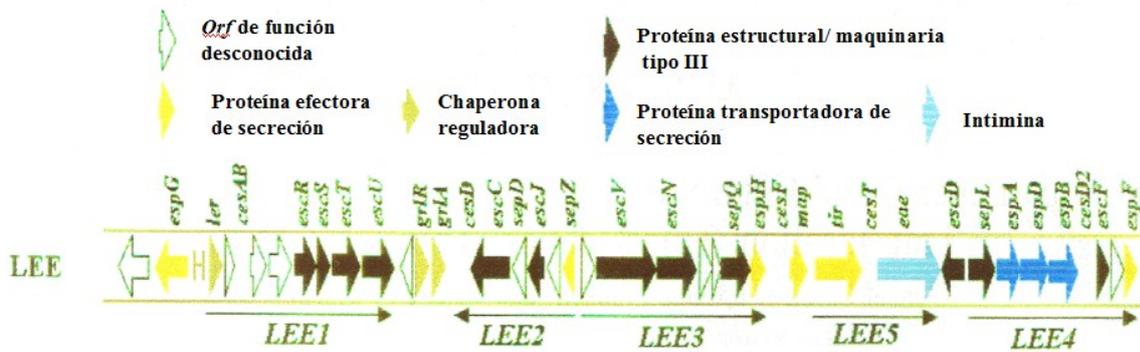


Figura 2. Locus LEE con la descripción de los operones que lo componen y tipos de proteína codificadas en ellos. Modificado de “Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections: Translocation, Translocation, Translocation” de Garmendia *et al*, 2005.

El TTSS es utilizado por los patógenos para traslocar directamente factores de virulencia desde la bacteria hacia las células blanco de los hospederos en un solo paso (Figura 3). El cuerpo basal del TTSS esta compuesto por EscC, las proteínas de membrana interna EscR, EscS, EscT, EscU y EscV, mas la lipoproteína EscJ, que conecta la membrana interna y externa. EscF constituye la estructura “aguja”, mientras que las subunidades de la EspA polimerizan a la forma EspA filamentosa. EspB y EspD forman el poro de translocación en la membrana plasmática de la célula huésped, conectando la bacteria con la célula eucariota a través de los filamentos de EspA. La ATPasa citoplasmática EscN otorga la energía al sistema hidrolizando las moléculas de ATP a ADP (Garmendia *et al*, 2005).

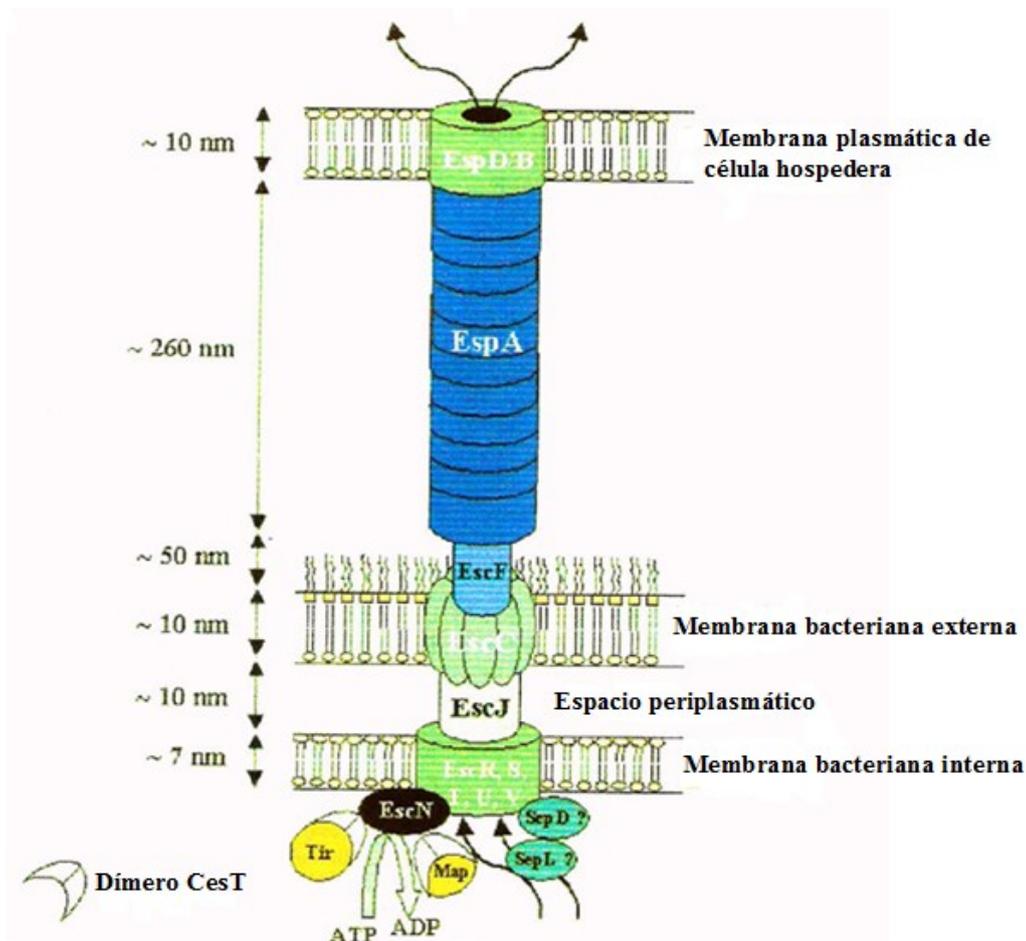


Figura 3. Sistema de secreción tipo III (SSTT), con las diferentes proteínas que lo componen. Modificado de “Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections: Translocation, Translocation, Translocation” de Garmendia *et al*, 2005.

Sin embargo, no todas las STEC expresan la proteína Intimina. Se sugiere la presencia de otros factores de adherencia en cepas de *E. coli* productoras de Stx de serotipos no-157 que perdieron el gen *eae*, y que igualmente están asociadas a diarreas con sangre y SHU (Dytoc *et al*, 1993). Se ha demostrado que existen otros factores de virulencia fuera del locus LEE asociados a la adherencia y toxicidad en cepas STEC aisladas de pacientes con CH o SHU.

La adherencia a las células epiteliales intestinales, en la infección producida por STEC, es un fenómeno que hasta ahora no se entiende completamente. El único factor reconocido como importante en este proceso, es la proteína Intimina, codificada por el gen *eae*, y que se encuentra en cepas STEC O157 y otros serogrupos relacionados. Garrido *et al* describieron el año 2006, 16 variantes para este gen, y concluyeron que existe una gran diversidad en el locus LEE de animales y humanos, pues también distinguieron para *tir* 4 variantes, 4 para *espA*, 3 para *espB* y 3 para *espD*.

Considerando el aumento de cepas carentes de este gen implicadas en casos de colitis hemorrágica y SHU, resulta interesante estudiar la participación de factores diferentes a Intimina en este fenómeno.

Gen *ent*

Jores *et al*, el año 2005, describieron a este gen como una enterotoxina que sería homóloga de la enterotoxina SenA de *Shigella flexneri*.

Gen *efa1*

Nicholls *et al*, el año 2000, describieron el gen *efa1*, (*E. coli* factor for adherence), el cual está presente en cepas STEC no-O157. Este gen codifica un factor de virulencia que contribuye a la adhesión de estas cepas, pero no estaría relacionado con las lesiones A/E (Stevens, 2002).

Plásmido pO157

Se describe además un plásmido de 60 MDa, denominado plásmido pO157, que porta el operón y codifica una toxina designada enterohemolisina de EHEC, hemolisina enterohemorrágica o enterohemolisina (EHEC-*HlyA*), codificada por el gen *ehxA*, que está presente en la mayoría de STEC, principalmente en O157:H7. Esta hemolisina permite extraer el hierro de los eritrocitos y utilizarlo (Schmidt *et al*, 1995).

En este mismo plásmido se codifica también una serinaproteasa (EspP), inhibidora del factor V de la coagulación, que favorece el sangrado (Schmidt *et al*, 1995).

Otro factor que se indica en la adhesión a los enterocitos es el gen *saa* (adhesina autoaglutinante de STEC), que codifica para la proteína Saa. Este gen se ha identificado como un factor de virulencia asociado a la adhesión de STEC que no poseen el locus LEE (Jenkins, 2003). Un estudio realizado el año 2005 por Tatarczak, detectó a dos cepas *eae* (-) que portaban este gen. Estudios demuestran que este gen estaría relacionado al ganado bovino y también se ubicaría en el plásmido de 60 MDa (Paton *et al*, 2001). Además, es más frecuente encontrarlo en cepas de bovinos que de humanos (Jenkins *et al*, 2003). Es importante destacar que este mismo autor reconoce una correlación positiva entre este gen y *HlyA*.

Gen *Iha*

Por otro lado, Tarr *et al* (2000), describieron el gen *iha* (*V. cholerae* IrgA-homologue adhesin), que codifica para una posible adhesina en ECEH O157:H7, relacionando esta proteína con adherencia a células Vero. Sin embargo, al comparar la capacidad de adherencia entre una mutante no fimbriada de *E. coli* transformada con este gen respecto de una cepa con una mutación en *iha*, no observaron diferencias.

Gen *lpf*

Es uno de los pocos factores de adhesión de STEC O157:H7 asociados con colonización intestinal. Torres *et al*, el año 2002, identificaron y caracterizaron el operón fimbrial *lpf*ABCC`DE en ECEH O157: H7, que le confiere adherencia a células Vero. Se

describió que esta región cromosomal estaría estrechamente relacionada al gran operón fimbrial polar (*lpf*) de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Al introducir los genes *lpf* desde la cepa ECEH EDL933 a una cepa no fimbriada de *E. coli* K-12, observaron la expresión de fimbria y un aumento en la adherencia a cultivos celulares (Torres *et al*, 2008).

Se demostró que el gen *lpf* es altamente prevalente entre las cepas *E. coli* LEE (+), incluyendo a STEC O157:H7 asociadas a cuadros epidémicos severos (Torres *et al*, 2002).

Por todo lo recientemente descrito, es interesante determinar la real relevancia de cepas de STEC aisladas en bovinos. Lo anterior permitirá contar con información respecto a las cepas aisladas desde esta especie animal, y si es que éstas constituyen un riesgo para la salud pública en Chile. De ser así, debiera ser considerada en un programa de control destinado a tomar medidas que disminuyan el número de casos de la patología que produce esta bacteria en la población humana. Medidas que además, debieran aplicarse en toda la cadena de producción de la carne, desde el manejo a nivel de planteles hasta el faenamiento en los mataderos correspondientes.

También es esencial educar a la población para evitar la contaminación cruzada, pues se describe que muchos casos de infección ocurren de esta manera. Así, se espera que la incidencia en nuestro país disminuya y que la calidad microbiológica de la carne bovina mejore para que la población pueda consumir tranquilamente este producto animal.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Determinar la presencia de ciertos factores de virulencia de cepas STEC aisladas desde bovinos sanos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la portación de STEC en heces de bovinos de las plantas faenadoras muestreadas.
- Determinar las frecuencias de distribución de las Shigatoxinas I, II, o ambas, presentes en las cepas de STEC aisladas de bovinos aparentemente sanos.
- Conocer la frecuencia de distribución de Intimina y de algunos factores de virulencia asociados a la Isla Genómica de Patogenicidad LEE.
- Determinar los serogrupos dentro de las cepas STEC aisladas desde heces bovinas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño

Se estableció un estudio descriptivo para determinar la presencia de shigatoxinas y genes de adhesión distintos a Intimina tales como *saa*, *hlyA*, *iha*, *ent*, *efa1*, *lpf* y *eae* en cepas aisladas de *E. coli* aisladas de bovinos aparentemente sanos. Este estudio se realizó 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

Se tomaron de manera aleatoria, durante el período de Mayo a Diciembre del año 2006, muestras fecales en dos plantas faenadoras de la Región Metropolitana, región donde se beneficia aproximadamente un 40% de la masa ganadera nacional. Los bovinos fueron seleccionados aleatoriamente, y se consultó la guía de libre tránsito para conocer el origen de los animales incluidos en el estudio.

Los planteles seleccionados son considerados grandes plantas faenadoras, y es donde se beneficia un alto porcentaje de todos los animales faenados en la Región Metropolitana. Aproximadamente el 50% de las muestras fueron tomadas en cada planta faenadora.

Las muestras se colectaron en la sala de eviscerado de la planta faenadora, a través de la obtención de las heces a nivel rectal, en bovinos aparentemente sanos provenientes de diferentes partes del país, principalmente del área central, y consumidos en su mayoría en la misma zona. Se depositaron aproximadamente 10 gr. de heces en frascos plásticos, y en un tiempo menor a 2 horas fueron transportadas al laboratorio en medio Cary Blair. Una vez llegadas al laboratorio, inmediatamente se sembraron en placas de agar McConkey y se incubaron a 37°C por 24 horas.

Tamaño muestral

Durante el periodo 2006 se estudió un total de 385 muestras de bovinos aparentemente sanos, con una prevalencia estimada de STEC en esta especie del 20% (considerando estudios nacionales e internacionales), un nivel de confianza de 95% y un error aceptado del 20% (Win Episcopo 2.0).

Las muestras fueron obtenidas con un intervalo entre ellas dado por el total de animales faenados por día, para minimizar la intencionalidad en la toma de las muestras.

I CARACTERIZACIÓN DE SHIGATOXINAS E INTIMINA

a) Identificación de *E. Coli*

De cada placa de agar McConkey se seleccionó un máximo de 10 colonias con fenotipo de *E. coli*. Estas muestras se sembraron nuevamente en una placa de agar McConkey y se incubaron por 18 a 24 hrs. a 37°C.

b) Obtención del ADN bacteriano para PCR.

Las colonias seleccionadas se suspendieron en 150 µL de agua grado biología molecular (AppliChem, catálogo A7398) con 0,1% de Tritón 100x (Winkler®).

Esta mezcla se hirvió por 5 minutos a 100 °C por dos veces con un paso intermedio de agitación por vortex. Luego se centrifugaron a 8000 rpm, por 5 minutos a una temperatura de 16°C, para precipitar las células que no fueron lisadas junto con los restos celulares, de tal forma que en el sobrenadante se contuvo el ADN molde.

Cuando el lisado se usó inmediatamente, se mantuvo a 4°C, y cuando se conservó para su posterior uso, se mantuvo a -20°C.

c) PCR Múltiplex

El lisado bacteriano se utilizó para la amplificación de los genes *stx1*, *2* y *eae*.

El programa utilizado es el establecido como protocolo en trabajos con cepas de *E. coli* desarrollados en el laboratorio de Microbiología del Programa de Microbiología en la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile (Vidal *et al*, 2005).

Se utilizaron los partidores descritos en la tabla 1 y sintetizados por Invitrogen®.

Tabla 1: Secuencia nucleotídica de los partidores específicos para Shigatoxinas e Intimina

Partidor	Tamaño de amplificado	Secuencia nucleotídica (5' -3')	Referencia
Shigatoxina 1	348 pb	CAC CAG ACA ATG TAA CCG CTG CAG TTA ATG TTG TTG CGA ACG	Cebula <i>et al</i> , 1995.
Shigatoxina 2	584 pb	ATC CTA TTC CCG GGA GGT TAC G CGC TCA TCG TAT ACA CAG GAG C	Cebula <i>et al</i> , 1995.
Intimina	482 pb	TCA ATG CAG TTC CGT TAT CAG TT GTA AAG TCC GGT ACC CCA ACC TG	Vidal <i>et al</i> , 2005.

Como control negativo se utilizó la cepa *E coli* K-12 MG1655 (ATCC 700926), y como control positivo la cepa positiva de *E coli* productora de shigatoxina O157:H7 EDL933.

El volumen final de reacción fue de 25 uL preparado según indica la tabla 2.

Tabla 2: Componentes utilizados en PCR Múltiple

Componentes	Cantidad
Buffer para PCR (Invitrogen®)	2,5 µL
Cloruro de Magnesio 50Mm (Invitrogen®)	0,75 µL
Partidor F STX1	1 µL
Partidor R STX1	1 µL
Partidor F STX2	1 µL
Partidor R STX2	1 µL
Partidor F <i>eae</i>	1 µL
Partidor R <i>eae</i>	1 µL
Deoxinucleótido trifosfato (DNTP) 200 um (Invitrogen®)	0,5 µL
Agua estéril desionizada	12,15 µL
Muestra (Lisado bacteriano)	3 µL
Taq polimerasa (Invitrogen®, 5 U/µL)	0,1 µL
Volumen total	25 µL

La reacción de amplificación se realizó en un termociclador Bio-Rad, la que se inició con la denaturación del material genético por 3 minutos a 94°C y continuó 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, se incubó por 7 minutos a 72°C finalizando el PCR y manteniéndose a 4°C terminado el programa.

d) Electroforesis y lectura del PCR

Una vez terminadas las amplificaciones se tomaron 10 µL de muestra que fueron sometidas a electroforesis en un gel de agarosa al 2% preparado en 75 ml de buffer Tris-ácido acético-EDTA TAE 0.5X (Sigma ®). La muestra se corrió a 80 volts por 60 minutos, y se utilizó un ADN marcador de 100 pb (Invitrogen®). Cada muestra fue mezclada con un buffer de carga que contiene glicerol y azul de bromofenol para visualizar la migración de la muestra.

Se observó el resultado de la electroforesis mediante la tinción del gel con bromuro de etidio 0,5 µg/ml por 20 minutos y la exposición del gel a la luz UV. La imagen se captó usando el software DigiDoc (Kodak). La visualización y el análisis de la imagen permitió, de acuerdo al peso molecular, discriminar las *E. coli* positivas a Shigatoxinas e intimina.

II Determinación de los serogrupos más prevalentes

La caracterización serológica de las cepas se realizó posterior a la obtención del ADN bacteriano. Las cepas que resultaron positivas a Shigatoxinas al PCR, 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 3). El volumen final de reacción fue de 25 µl.

Tabla 3. Secuencia nucleotídica de los partidores para el polisacárido O157.

Partidor	Tamaño de amplificado	Secuencia Nucleotídica (5`-3`)	Referencia
O157	497 pb	AAG ATT GCG CTG AAG CCT TTG CAT TGG CAT CGT GTC GAC AG	Desmarchelier <i>et al</i> , 1998.

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 shigatoxina E211 (O157:H7), y la O157:H7 EDL933.

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 continúa 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 incubó por 7 minutos a 72°C finalizando el PCR y manteniéndose a 4°C.

b. Serotipificación

La determinación del antígeno O de las cepas no-O157 fue realizada siguiendo la metodología descrita por Guinée *et al* (1981), y modificada por Blanco *et al* (1996).

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.

Se serotipificaron mediante la utilización de antisueros específicos O y H. Se emplearon 173 antisueros O capaces de reaccionar específicamente con los antígenos O1 a O181 de *E. coli*. Los 173 antisueros O monovalentes se repartieron en 25 sueros polivalentes formados por 6 o 7 antisueros monovalentes.

Previamente se realizó la preparación de las suspensiones bacterianas. Se cultivaron las cepas en agar trisona-soja (TSA) a 37°C por 18 horas. Luego, se suspendieron en 2 ml de solución salina (0,85% ClNa) y se ajustó la concentración bacteriana ($1,8 \times 10$ bacterias/ml) por comparación con el tubo número 6 de la escala de Mc Farland. Este paso se realizó por duplicado. Se calentó un tubo a 100° C/1 hr y otro a 121°C/2,5 horas, para inactivar el antígeno K y desenmascarar el antígeno O. Los antisueros O se titularon frente a las cepas control para escoger la dilución del ensayo, utilizando placas de microtitulación de 96 pocillos de fondo en “V”. Luego, se agregaron 90 ul de solución salina en el primer pocillo de cada fila y 50 ul en los restantes 11 pocillos de cada fila de la placa. Se añadió 10 ul del antisuero monovalente al primer pocillo, se mezcló y se hicieron diluciones seriadas (1/2). Para ello, fueron transferidos 50 ul del primer pocillo al siguiente, se mezcló y esta operación se repitió hasta el pocillo décimo. Los pocillos 11 y 12 de cada fila se utilizaron como controles negativos, desechando los 50 ul restantes.

Fueron añadidos 50 ul de la suspensión bacteriana calentada, formalinizada y teñida a los 12 pocillos de cada fila, empezando por el pocillo n° 12 y avanzando hasta el n° 1. Las suspensiones calentadas fueron enfrentadas con los 173 antisueros O monovalentes. En los pocillos positivos, la aglutinación provocó la formación de una película que impide la sedimentación dando lugar a la formación de acúmulos de bacterias que se visualizan en forma de botones azulados.

III Caracterización de los genes distintos a Intimina.

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

a) PCR simple

Mediante la misma técnica descrita en el punto I c, se hizo la determinación de los posibles genes participantes en la adhesión de las cepas que resultaron positivas a la presencia de Shigatoxinas utilizando secuencia de partidores específicos para cada uno de los genes descritos (Tabla 4).

Tabla 4: Secuencia nucleotídica de los partidores para los genes *efa1*, *ent saa*, *hly*, *iha*, y *lpf*.

Partidor	Tamaño de amplificación	Secuencia nucleotídica (5`-3`)	Referencia
<i>efa1 O157</i>	456 pb	AAC TAT CCT GCC GCC TCA GA GCC TGC GAT AAC AGC ATC AA	Vidal <i>et al</i> , 2007.
<i>efa1 (no O157)</i>	827 pb	AAC GCT GCA TAC AAA AAT CAT TC TCC GTA TTT CTG TCT TCT GAG GT	De Saint-Pierre <i>et al</i> , 2006.
<i>Ent</i>	607 pb	TCA TCC CCT CAA TTA TTA AGC AA AAA AGC AAC CCA GGA ACA TTA TT	De Saint-Pierre <i>et al</i> , 2006.
<i>Saa</i>	119 pb	CGT GAT GAA CAG GCT ATT GC ATG GAC ATG CCT GTG GCA AC	Paton y Paton, 2002.
<i>Hly</i>	569 pb	AGC TGC AAG TGC GGG TCT G TAC GGG TTA TGC CTG CAA GTT CA	Vidal <i>et al</i> , 2007.
<i>Iha</i>	792 pb	TGG TAC GGG TAA AAC AGG AG CTG CGT ACA AGC TCA CGA CC	Vidal <i>et al</i> , 2007.
<i>lpf</i>	273 pb	CCT TGC GTA CTG TCC GTT GA AGC GAC CAG GGT ATT GCT GT	Vidal <i>et al</i> , 2007.

Para el gen *ent*, se utilizó el programa SAA, el que utiliza una temperatura de alineamiento de 60°C (De Saint-Pierre *et al*, 2006), y se usó como control negativo a *E. coli* K-12 MG1655 (ATCC 700926). Como control positivo, se utilizaron *E. coli* productora de shigatoxina E112, una EPEC (E2348/69) y *E. coli* productora de shigatoxina O157:H7 EDL933.

Para el gen *efa1* no-O157, se utilizó el programa SAA, el que utiliza una temperatura de alineamiento de 60°C (De Saint-Pierre *et al*, 2006). Los controles positivos y negativos fueron los mismos utilizados para el gen *ent*.

Las cepas O157 tienen el gen *efa* truncado, diferentes a las no-O157. Para estas cepas, se realizó un programa que parte con una denaturación del ADN a 94°C por 3 minutos, continuando con 35 ciclos de amplificación (1,5 minutos 94°C, 1'15'' a 60°C, y 1 minuto a 72°C). Al término de los 35 ciclos, se incubó por 7 minutos a 72°C, finalizándose la PCR y manteniéndose a 4°C terminado el programa. El control positivo fue *E. coli* productora de Shigatoxina O157:H7 EDL933, y el negativo *E. coli* K-12 MG1655 (ATCC 700926).

Para el gen *saa*, se usó el mismo programa que se utilizó para el gen *efa* de las cepas O157. Como control negativo, se utilizó *E. coli* K-12 MG1655 (ATCC 700926), y como control positivo, se usó una cepa de un aislamiento clínico humano, la *E. coli* E026.

En el caso del gen *hlyA*, se utilizó el programa TIR (Vidal *et al*, 2007), el que parte con una denaturación a 95°C por 5 minutos, con sólo 30 ciclos de amplificación (30 segundos a 95°C, 1 minuto a 56°C y 1 minuto a 72°C). Luego, se incubó por 7 minutos a 72°C, finalizándose la PCR y manteniéndose a 4°C terminado el programa. Se usó el control positivo *E. coli* productora de Shigatoxina O157:H7 EDL933, más *E. coli* K-12 MG1655 (ATCC 700926) como control negativo.

Para los genes *iha* y *lpf*, se utilizó el programa SAA (De Saint-Pierre *et al*, 2006), y se usaron los controles *E. coli* productora de Shigatoxina O157:H7 EDL933 como control positivo, y *E. coli* K-12 MG1655 (ATCC 700926) como control negativo.

b) Electroforesis y lectura de PCR

Se utilizó la misma técnica descrita en el punto 1d. Solo difiere en el uso de los controles: como control positivo se ocupó a *E. coli* productora de Shigatoxina O157:H7 EDL933, y como control negativo agua grado biología molecular marca AppliChem, catálogo A7398.

IV Análisis de Resultados.

La descripción de las cepas STEC, se realizaron mediante el análisis de las imágenes de los geles de la electroforesis, reconociendo los pesos moleculares específicos de cada Shigatoxina y de Intimina.

La presencia de los factores de adhesión distintos a Intimina también se realizó mediante el análisis de las imágenes obtenidas en la electroforesis.

Se realizaron cálculos de porcentajes para obtener un estudio descriptivo de la situación actual de STEC en el país en la especie bovina, y se consideraron las siguientes variables:

- Determinación de la presentación de los distintos serogrupos (O157 y no-O157).
- Perfil toxigénico de la especie estudiada (StxI, StxII o ambas).
- Presencia del gen *eae*, para la proteína Intimina.
- Presentación de los genes de adhesión distintos a Intimina (*efa1*, *ent*, *saa*, *hly*, *iha* y *lpf*).

RESULTADOS

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DE STEC

- **Determinación de de Shigatoxinas e Intimina.**

Se aislaron 46 cepas de STEC desde el contenido intestinal (recto) de un total de 385 muestras de bovinos analizados en dos plantas faenadoras de la Región Metropolitana, lo que correspondió a un 11,9%.

Se caracterizó el perfil toxigénico de las cepas de STEC aisladas en bovinos (Tabla 5). Se trabajó con 52 aislamientos, ya que dentro de un mismo individuo se encontraron colonias distintas. En esta especie animal, el 9,6% de las cepas fueron positivas a StxI (5/52). Para StxII, fueron 36 de 52 cepas, correspondientes al 69,2%. El 21,1% restante (11/52) correspondió a cepas que portaban tanto StxI como StxII. Además, solo 4 de estas 52 cepas bovinas mostraron la presencia del gen *eae* (Intimina), responsable de la lesión de adherencia y borrado (A/E) característico de cepas que presentan este factor de virulencia, lo que corresponde al 7,7% (Figura 4).

Tabla 5. Perfil toxigénico de 52 muestras positivas a STEC

Perfil Toxigénico (n=52)	
Stx I	9,6% (5/52)
Stx II	69,2% (36/52)
Stx I y II	21,1% (11/52)
Intimina (<i>eae</i>)	7,7% (4/52)

De las 4 cepas positivas a Intimina, dos también lo eran para StxI y las dos restantes, para StxII (Tabla 6).

Tabla 6. Perfil toxigénico de las 4 muestras positivas a Intimina

Perfil Toxigénico (n=4)	
Stx I	50% (2/4)
Stx II	50% (2/4)

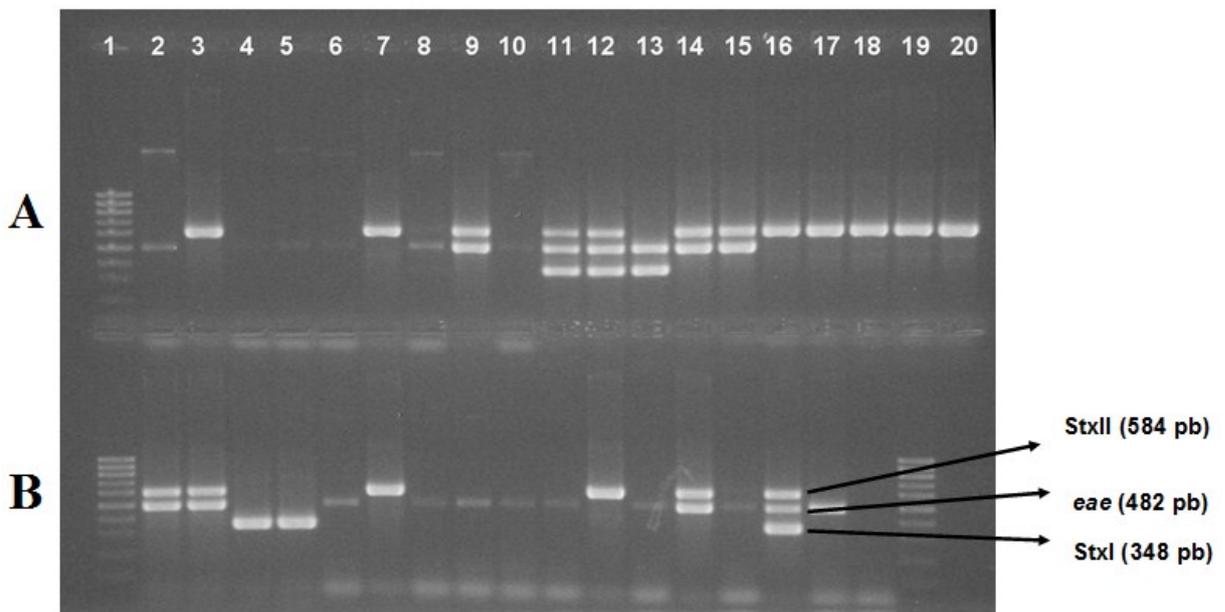


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR Múltiple, para determinar la presencia de los genes que codifican para Shigatoxina I, Shigatoxina II y gen *eae* (Intimina).

- A.** En la línea 1, marcador de 100 pb de peso molecular; líneas 3, 7, 9, 11, 12, 14 a 20, muestras positivas a Shigatoxina II; líneas 11 a 13, muestras positivas a Shigatoxina I; líneas 2, 4 a 6, 8, 10 a 15, muestras positivas a *eae*.
- B.** En la línea 1 y 19, marcadores de 100 pb de peso molecular; línea 16, control positivo a Shigatoxina I, II y gen *eae*; línea 17, EPEC, control positivo a gen *eae*; línea 18, control negativo; líneas 2, 3, 7, 12 y 14, muestras positivas a Shigatoxina II; líneas 2, 3, 6, 8 a 11, 13 a 15, muestras positivas a *eae*; líneas 4 y 5, muestras positivas a Shigatoxina I.

- **Determinación de serogrupos**

El serogrupo más detectado fue el O171H2, con 7 cepas, lo que equivale al 13,46%. Le siguió, con 5 cepas, el serogrupo O20H19. Se encontró 1 cepa O157, lo que corresponde al 1,9%. El resto se detalla en la Tabla 7.

Tabla 7. Determinación de serogrupos en cepas positivas a STEC

Serogrupo	Número de cepas	%
O171H2	7	13,46%
O20 H19	5	9,6%
O130 H11	4	7,69%
O113 H21	4	7,69%
O139H19	3	5,76%
NT	3	5,76%
O156 H-	2	3,84%
O172H-	2	3,84%
O157	1	1,9%
O22	1	1,9%
O2	1	1,9%
O136:H16	1	1,9%
O174:H21	1	1,9%
O181:H49	1	1,9%
O8:H16	1	1,9%
O113:H4-H21	1	1,9%
O103:H42	1	1,9%
O163:H19	1	1,9%
O98H-	1	1,9%
O117:H7	1	1,9%
O76	1	1,9%
O20H7	1	1,9%
O103H-	1	1,9%
O46	1	1,9%
O15:H27	1	1,9%
O174:H28	1	1,9%
O171	1	1,9%
O136H-	1	1,9%
NT H19	1	1,9%
O7	1	1,9%

- **Caracterización de otros genes**

Se encontró que las cepas bovinas en su mayoría presentan los genes de virulencia caracterizados. Los resultados muestran que el 96,1% de las cepas posee el *iha*, sin discriminar si es O157 o no-O157. Solamente 1 aislamiento presentó el gen *lpf*, y correspondió a la única cepa O157, asociación que ha sido descrita. Es importante mencionar que el aislamiento O157:H7 presentó todos los genes estudiados, a excepción del gen *saa*. El gen *efaO157* efectivamente estuvo en esa cepa (1,9%), al igual que el gen *ent*, que se encontró, además en una sola cepa no-O157 (2 de 52, equivalente al 3,8%). El gen *efa1*, para las no-O157, se detectó en tan sólo 2 cepas (3,8%). 31 cepas presentaron *saa* (59,6%). Como ya se mencionó, el gen *saa* no fue encontrado en el aislamiento O157 pero sí en las no-O157. El gen *hlyA* se presentó en 35 de las 52 cepas (67,3%). Estos últimos dos resultados concuerdan con la tendencia descrita en otros estudios

Los resultados se pueden apreciar en la Tabla 8.

Tabla 8. Genes de virulencia presentes en cepas STEC.

Genes de Virulencia (n=52)	
<i>ent</i>	3,8% (2/52)
<i>efa1</i>	3,8% (2/52)
<i>hlyA</i>	67,3% (35/52)
<i>lpf</i>	1,9% (1/52)
<i>saa</i>	59,6% (31/52)
<i>iha</i>	96,1% (50/52)
<i>efa 1 (O157)</i>	1,9% (1/52)

DISCUSIÓN

En este estudio, se determinó que el nivel de portación de *Escherichia coli* productora de Shigatoxinas en bovinos aparentemente sanos, faenados en dos plantas faenadoras de la Región Metropolitana, fue de un 11,9%. Investigaciones previas realizadas en Chile difieren con estos resultados. Según Borie *et al*, el año 1997, la prevalencia de *Escherichia coli* en bovinos alcanzaba un 28,7%. En el mismo estudio se señaló además que la especie porcina obtuvo una mayor prevalencia, la cual fue de 68,3%. Otro estudio realizado en el país por Ríos *et al* (1999), concluyó lo mismo: que la especie porcina es más prevalente si es comparada con la especie bovina. Estos dos estudios son de los pocos que avalan a la especie porcina como principal reservorio a nivel mundial. Es importante destacar que nuestros resultados no concuerdan con estas publicaciones nacionales, pues en paralelo a este estudio también se determinó la prevalencia de *Escherichia coli* productora de Shigatoxinas en los cerdos, siendo ésta de un 7,2%, no concordando con los análisis ya mencionados. Esta cifra, sin embargo, está acorde con referencias internacionales que señalan una prevalencia de STEC en un 7,5% en esa especie.

Las diferencias encontradas en estos estudios podrían deberse a las técnicas utilizadas. En los estudios de los años '90, las muestras positivas a *E. coli* fueron hibridizadas con sondas asociadas a las Shigatoxinas I y II, lo que podría arrojar resultados falsos positivos.

Estos resultados disímiles podrían explicarse también por el origen geográfico de los bovinos faenados. Aunque desconocemos de donde provinieron los planteles muestreados del estudio de Borie *et al*, sabemos que en nuestro estudio los animales provenían de lugares tan diversos como Ovalle, Rancagua, Valdivia y Puerto Montt, por nombrar solo algunos. Sería interesante analizar ambos estudios tomando como referencia este tópico, ya que quizás podría explicar la diferencia entre los resultados.

Es importante analizar el hecho de que actualmente las técnicas de manejo de los planteles de bovinos han experimentado mejoras, se hacen manejos sanitarios más acuciosos para mejorar la producción y en muchos de ellos se inmuniza contra *E. coli*. El

uso de probióticos, de suplementos o cambios en la dieta que se han incorporado con el tiempo para obtener una mayor ganancia en la canal podría traducirse en un cambio en la flora intestinal de los animales.

Además, gran cantidad de la carne bovina que se produce en el país se exporta para así obtener un mejor precio (muchas veces los costos de producción nacional sobrepasan los costos de las carnes importadas), y el mercado en el cual está enfocado Chile son principalmente países desarrollados (UE, Japón, EEUU). Estos países tienen altos estándares de calidad, son tremendamente exigentes y los planteles nacionales deben cumplir con estos requisitos. El Servicio Agrícola Ganadero (SAG) otorga una certificación oficial a los planteles de animales bovinos según el tipo de producción que se denomina PABCO (Programa de Planteles de Animales Bovinos bajo Certificación Oficial). Es así como según distintos parámetros (manejo de animales, instalaciones y registros de identificación y movimientos del plantel, uso de insumos alimenticios y medicamentos veterinarios de uso restringido, bienestar animal), los planteles PABCO se categorizan en nivel A, B y C, donde PABCO A es el más estricto en todos los ítems recién mencionados.

La Unión Europea, los Estados Unidos y otros, exigen que la carne importada sea de alta calidad, es por esto que sólo aceptan productos provenientes de PABCO nivel A. Esto podría estar directamente relacionado con mejoras en la producción animal, lo que se traduce también en un buen manejo sanitario y por lo tanto, en una disminución en la presencia de esta bacteria.

Por otro lado, la certificación de exportaciones incluye un programa de reducción de patógenos que se aplica en plantas faenadoras exportadoras y su propósito es otorgar una garantía de alta confiabilidad a los embarques de carne certificados por el estado a través del SAG. En la canal se buscan bacterias o agentes indicadores, dentro de las cuales se encuentra *E. coli*, relacionada con buenas prácticas de higiene. También se detecta *Salmonella spp.*, que evalúa el sistema HACCP (Bravo, 2007).

Dentro del 11,9% de cepas positivas a STEC encontradas en este estudio, al analizar el perfil toxigénico, StxII fue la más prevalente, con un 69,2%, seguida de aquellas cepas positivas a ambas toxinas en un 21,1% y un 9,6% corresponde a las cepas StxI. Al comparar estos resultados con los obtenidos en trabajos nacionales (Borie *et al*, 1997), difieren completamente en la prevalencia al ser Stx I la más frecuente (72,5%). Stx II estaría presente en el 15% de los casos y un 12,5% correspondería a aquellas cepas con ambas toxinas. Por otro lado, el estudio realizado en 1999 también en Chile por Ríos *et al*, dice que en un 70,4% se detectan ambas toxinas, siendo éste perfil el más frecuente. Sin embargo, estudios realizados en Argentina por Padola *et al* el año 2004, reportan un 45,8% de prevalencia para StxII, un 11,9% de cepas positivas a ambas toxinas y de 5,1% de cepas positivas a StxI, mientras que en Australia y en Nueva Zelandia se observa la misma tendencia (Leotta *et al*, 2008).

Estas diferencias en los perfiles toxigénicos de cada estudio realizado en el país podrían explicarse a un cambio natural en la frecuencia de presentación de cada toxina, considerando que las prevalencias encontradas en nuestro estudio coinciden con otros reportes internacionales actuales. Cambios en el manejo de los predios, en el tipo de alimentación y en los manejos sanitarios podrían estar asociados a esto. Padola *et al*, en el 2004, explican esto con un cambio en la dieta que se le otorga al animal. Los bovinos están adaptados para pastorear y su sistema ruminal está fisiológicamente preparado para esta labor. Con la estabulación de los animales, muchos predios suplementan con granos en un porcentaje variable a su dieta, lo que provocaría una disminución en su pH ruminal e intestinal. Esto generaría una mayor producción de una toxina en relación a la otra (Rigobelo *et al*, 2008).

Otras publicaciones (Nataro y Kaper, 1998; Ríos *et al*, 1999, y Leotta *et al*, 2008) mencionan que es StxII la que se asocia a los casos más graves (principalmente SHU), y se reporta como la más tóxica en relación a StxI. Por lo tanto, la mayor prevalencia de StxII podría relacionarse a un aumento en los cuadros más severos de esta patología.

En relación a Intimina, proteína que ha demostrado ser necesaria para la actividad de esfecelación y borrado, un 7,7% de nuestras cepas fueron positivas. Borie *et al* (1997), registraron un porcentaje del 35%, y por otro lado, Ríos *et al* (1999), detectaron este gen en un 100% de las cepas aisladas desde pacientes con SHU. Al mismo tiempo, Ríos

describe en bovinos que el 25% (1/4) de las cepas aisladas fueron positivas a Intimina. En Argentina (Padola *et al*, 2004), la frecuencia de detección del gen fue de un 38,6%, mientras que en España fue detectado en un 29% de las cepas aisladas (Blanco *et al*, 2004). Los resultados de este importante factor de virulencia fueron bajos en comparación con otros factores de adhesión no comúnmente señalados como productores de patogenicidad, sin embargo esto podría asociarse a la baja frecuencia encontrada del serotipo O157.

El C-terminal al final de Intimina es responsable de la unión al receptor y ha sido sugerido que diferentes Intiminas pueden ser responsables de distintos tropismos a tejidos celulares (Blanco *et al*, 2004), por lo que la diferenciación de alelos de Intimina representaría una importante herramienta para tipificación de STEC, tanto en la rutina diagnóstica como en estudios epidemiológicos y clonales, y sería conveniente analizarlo como complemento a este estudio.

Muchos investigadores destacan la fuerte asociación entre la presencia de esta proteína y la habilidad de STEC de ocasionar cuadros más graves en humanos. A pesar de esto, la síntesis de Intimina no es esencial para la patogénesis como lo han demostrado otros estudios en que cepas STEC negativas a este gen han sido capaces de provocar SHU (Paton y Paton, 1999).

En términos generales, aunque el 7,7% obtenido en este estudio se encuentra por debajo de lo esperado, no necesariamente estaría relacionado con una menor capacidad de producir daño en la célula huésped, pues también se asocia a esta actividad otros mecanismos y genes que también fueron analizados. Además de la capacidad de producir Shigatoxinas e Intimina, STEC puede tener factores de virulencia accesorios de reemplazo, codificados por distintos genes.

Entre estos otros genes de virulencia, los más estudiados y caracterizados son *ent*, *efa1*, *hlya*, *iha*, *saa* y *lpf* (Vidal *et al*, 2007).

Paton y Paton el año 2001 describieron una nueva adhesina autoaglutinante que designaron Saa (Adhesina autoaglutinante STEC), y fue detectada en cepas STEC que carecían del gen *eae*, y que no se presentaban en cepas positivas a Intimina, pero igualmente eran capaces de generar cuadros severos como SHU, lo que podría ser un

importante mecanismo de adherencia ante la ausencia de Intimina. El gen *saa* encontrado en cepas que no poseen el locus LEE, fue aislado en este estudio en 31 muestras, correspondiendo al 59,6% del total. Estas 31 muestras no correspondieron a cepas que codificaban para Intimina, concordando con lo que dice Paton. Mientras, en Argentina, un estudio realizado por Blanco *et al* el año 2004 arrojó un 22% de cepas positivas a *saa*, cepas que también fueron *eae* negativas.

Otro estudio en Argentina también muestra que el gen *saa* no se asocia a cepas positivas a Intimina. Un 31,6% de cepas negativas al gen *eae* fueron positivas para *saa*, mientras que este gen no fue encontrado en aquellas cepas *eae* (-). (Luchessi *et al*, 2006; Vidal *et al*, 2007).

Otro gen aislado en alta frecuencia fue *hlyA*, presente en 35 de las muestras, lo que corresponde al 67,3%, que codifica la enterohemolisina (Ehly), también llamada hemolisina *E. coli* enterohemorrágica (EHEC-*HlyA*). Esta hemolisina estaría presente en la mayoría de las STEC, pero su patogenia en cuadros de SHU es aún incierta (Nataro y Kaper, 1998). Un estudio realizado en Argentina por Blanco *et al* el año 2004, un 46% de las cepas resultaron positivas para este gen.

En este estudio, el gen *iha* fue el más frecuentemente detectado. De un total de 52 muestras, 50 de ellas, es decir el 96,1%, fueron positivas a este gen. Esto sin embargo resulta paradójico, ya que algunas revisiones señalan que este gen codificaría una adhesina en cepas de STEC O157:H7 (Tarr *et al*, 2000), sin embargo esta cepa fue la de menor prevalencia en este estudio (1,9%). Cabe destacar la única cepa O157:H7 detectada en este estudio, fue positiva a este gen de virulencia.

Los genes *efa1* y *ent*, factores importantes en la adhesión de la bacteria a las células, fueron aislados en 3,8% de las muestras cada uno. Por último, los genes *lpf* y *efa1* O157 fueron aislados en 1,9% cada uno del total de muestras.

La presencia adicional de estos factores de virulencia hace pensar que la bacteria posee distintos mecanismos para adherirse y actuar en la célula blanco, no tan sólo depende de las ya estudiadas y mencionadas Shigatoxinas o de su principal factor de adherencia, la proteína Intimina, sino que enfoca hacia una nueva línea de investigación donde estos genes tendrían una importante participación dentro de la patogenicidad de

STEC. Esto también podría estar relacionado con la gran variedad de cuadros clínicos que provoca esta bacteria en su gravedad (SHU, colitis hemorrágica, colitis, no hemorrágica, cuadros asintomáticos), y podría deberse a la presencia o ausencia de cada gen.

Siguiendo con otra parte del estudio, se debe mencionar que tan sólo una cepa fue positiva a O157:H7 (1,9%), mientras que las no-O157 representaron el 98,1%. Dentro de éstos, los que destacan por su mayor presencia son los serogrupos O171:H2 (13,4%), O20:H19 (9,6%), O130:H11 y O113:H21 (7,6% respectivamente), O139:H19 y No Tipificables (NT) con un 5,7% cada una, O156H- y O172H- con un 3,8%. Es importante destacar que el serogrupo O113:H21 resultó ser común en Argentina y Brasil (Luchessi *et al*, 2006). Parma *et al*, el año 2000, también reportan que el serogrupo O157 no se detecta entre los bovinos faenados en Argentina. Estos resultados concuerdan con estudios realizados en el país por Prado *et al* en 1997, donde el 64% de las infecciones por STEC se producen por cepas no-O157. La tendencia en Latinoamérica es a una baja presencia del serogrupo O157, tal como lo demostró este estudio.

Por otro lado, al compararlos con el estudio del año 1999 de Ríos *et al*, se contraponen completamente, pues se indica que fue el serogrupo O157:H7 el más hallado, sin embargo, estudios actuales en nuestra región informan que son los no-O157 el serogrupo que se aísla con más frecuencia. Padola en el año 2002, detectó que sólo un 6,8% de las cepas fueron positivas a O157:H7 en Argentina, mientras que en Brasil, Aidar-Ugrinovich *et al*, en un estudio del año 2007, no detectaron este serogrupo.

Cepas de STEC capaces de producir infecciones en humanos pertenecen a un amplio número de serotipos O:H. Sin embargo, como lo revela este estudio, son las cepas no-O157 las más encontradas. Esto concuerda con la mayoría de las publicaciones de Europa y Australia al respecto, que señalan a las cepas no-O157 como más prevalentes.

En situaciones de brote, se observa que cuando el agente infectante es O157:H7 el riesgo de desarrollar SHU es 5 a 7 veces mayor en relación a las no-O157 (Prado *et al*, 2008). La que tiene mayor impacto clínico es la O157:H7, sin embargo, las no-O157 también pueden provocar severos cuadros y SHU. Dentro de estos serogrupos se puede mencionar a O26:H11, O55:H7, O55:H10, O111:H8 y O111:H30 (Nataro y Kaper, 1998).

A pesar de que el mayor porcentaje de las infecciones son producidas por serogrupos no-O157, aún sigue siendo importante la presencia de los serogrupos O157 (Prado *et al*, 2008). Una posible fuente de este serogrupo podría ser la carne que se importa, proveniente principalmente de países vecinos tales como Argentina, Brasil y Uruguay. De todas maneras esto sería algo complejo de comprobar puesto que el SAG no contempla dentro de su control alguna prueba que detecte STEC.

Se considera de relevancia mencionar de este estudio, que la única muestra del serogrupo O157:H7 fue positiva a casi todos los genes de virulencia que se analizaron. Cabe recordar que las cepas que traen consigo la información para codificar la proteína Intimina (*eae* +), son negativas al gen *saa*, y este sería el caso: presentó el gen *eae*, por lo que se esperaba la ausencia de *saa*. Fue positiva a los genes *iha*, *ent*, *efa* O157, *hly*_A y *lpf*. Hay que destacar que solamente esta muestra, la O157:H7, presentó el gen *lpf*, asociado a adherencia a células Vero. Con la detección de esta cepa, repleta de factores de virulencia, y además en tan baja frecuencia (1,9%), se podría conjeturar que se relacionaría con los cuadros más agresivos y con secuelas más marcadas en los pacientes infectados, sin embargo, no hay tanta información acerca de estos genes en las cepas aisladas en pacientes.

En este trabajo se encontraron múltiples genes asociados con factores de virulencia en cepas de *Escherichia coli* aisladas de heces de bovinos en matadero, es decir, carne potencialmente destinada al consumo humano. Por lo anterior, es importante insistir en la utilidad de contar con programas de control que sean frecuentes y periódicos en la industria alimenticia, con el fin de resguardar a la población. Sin embargo, esto sería inútil sin la educación de las personas sobre una correcta manipulación de los alimentos, considerando que la mayor parte de las intoxicaciones alimentarias se producen en las mismas casas.

Toda ésta 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.

Con este estudio, se puede establecer claramente que la especie bovina es la que se asocia con mayor frecuencia a STEC, y su presencia en los predios y mataderos concuerdan con lo que se describe a nivel mundial. Sus distintas cepas aisladas de

pacientes infectados con STEC se aíslan en la misma frecuencia reportada en diferentes trabajos. Hay que poner énfasis en esta situación epidemiológica, incorporar medidas sanitarias y de higiene a nivel no tan sólo de predio, sino que también de matadero, para evitar contaminación cruzada; uso del HACCP en la mayor parte de la cadena de producción y en la industria alimentaria, para así disminuir en alguna medida esta prevalencia. Sería interesante también realizar un muestreo bacteriológico con énfasis en la búsqueda o aislamiento en las carnes importadas para consumo nacional. Por otro lado, es sabido que las bacterias están sujetas a mutaciones y mecanismos de transferencia horizontal que permiten la aparición de nuevas cepas patogénicas, variantes o nuevos factores de virulencia, y desconocemos las interacciones que éstos pueden provocar al entrar en contacto las bacterias con el hospedero, tanto a nivel de salud animal como humana.

CONCLUSIONES

- En Chile, el bovino es un importante reservorio de STEC, aunque se ha observado una disminución en su frecuencia de aislamiento.
- Existe una mayor prevalencia de StxII en las cepas STEC detectadas en bovinos.
- La frecuencia de aislamiento del gen que codifica para Intimina (gen *eae*), fue menor en comparación con otros factores de adhesión.
- Se logró detectar otros genes asociados con probables mecanismos de virulencia y que aportan con la patogenicidad observada en ensayos *in vitro*, tales como *ent*, *efa1*, *saa*, *hlya*, *iha* y *lpf*.
- El serotipo O171:H2 fue el que más se detectó, y las cepas aisladas que se identificaron en su mayoría fueron las no-O157.
- Dadas las características genéticas y de acuerdo a los serogrupos de STEC encontrados en el reservorio bovino aparentemente sano, faenado en la Región Metropolitana, éstos podrían representar algún riesgo para el ser humano.

BIBLIOGRAFÍA

AIDAR-UGRINOVICH, L.; BLANCO, J.; BLANCO, M.; BLANCO, JE., LEOMIL, L.; DAHBI, G. 2007. Serotypes, virulence genes, and Intimin types of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) isolated from calves in São Paulo, Brazil. *Int. J. Food Microbiol.* 115: 297–306.

BANATVALA, N.; GRIFFIN, P.M.; GREENE, K.D.; BARRET, T.J.; BIBB, W.F.; GREEN, J.H., WELLS, J.G. 2001. The United States National Prospective Hemolytic Uremic Syndrome Study: microbiologic, serologic, clinical and epidemiologic findings. *J. Infect Dis.* 183:1063-1070.

BELONGIA, EA.; MACDONALD, KL.; PARHAM, GL.; WHITE, KE.; KORLATH, JA.; LOBATO, MN. 1991. An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 colitis associated with consumption of precooked meat patties. *J. Infect. Dis.* 164:338-43.

BERTIN, Y.; BOUKHORS, K.; PRADEL, V.; MARTIN, C. 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.; GEIER, D.; STEINRUCK, 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: 2483-2488.

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.

BLANCO, M.; BLANCO, J.; BLANCO, JE.; RAMOS, J. 1993. Enterotoxigenic, verotoxigenic and necrotoxigenic *Escherichia coli* isolated from cattle in Spain. *Am. J. Vet. Res.*, 54: 1446–1451.

BLANCO, JE.; BLANCO, M.; BLANCO, J.; MORA, A.; BALAGUER, L.; MOURIÑO, M.; JUAREZ, A.; JANSEN, WH. 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, J.; BLANCO, M.; BLANCO, JE.; MORA, A.; ALONSO, MP.; GONZALEZ, EA.; BERNADEZ, MI. 2001. Enterobacterias: características generales. Género *Escherichia*. Capítulo 21. En: *Manual de Microbiología Veterinaria*. Vadillo S., Píriz S & E. Mateos. Eds McGraw-Hill Interamericana, Madrid, España, pp. 301-325.

BLANCO, M.; BLANCO, JE.; MORA, A.; DAHBI, G.; ALONSO, MP.; GONZÁLEZ, EA.; BERNÁRDEZ, ML.; BLANCO, J. 2004. Serotypes, Virulence Genes and Intimin Types of Shiga Toxin (Verotoxin)-Producing *Escherichia coli* Isolates from Cattle in Spain and Identification of a New Intimin Variant Gene (*eae-ε*). *J. Clin. Microbiol.* 42, (2): 645-651.

BORIE, C.; SANCHEZ, ML.; 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.

BRAVO, A. 2007. Programa de reducción de patógenos. Boletín Veterinario Oficial, Salud Animal e Inocuidad de los Alimentos, División de Protección Pecuaria. SAG, Ministerio de Agricultura, Chile.

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.

CERDA, M.; TABOADA, H.; SOLAR, E.; CASTERAN, J.C.; COFRE, C.; DEL VALLE, M.; PENA, S. 1984. Síndrome hemolítico urémico. *Rev. Chil. Pediatr.* 55:29-33.

CIMOLAI, N.; BASALYGA, S.; MORRISON, BJ.; CARTER, J. 1994. A continuing assessment of risk factors for the development of *Escherichia coli* O157:H7-associated hemolytic uremic syndrome. *Clin. Nephrol.* 42:85-89.

CORDERO, J.; BAEZA, J.; FIELBAUM, O.; SAIEH, C.; VARELA, M.; RODRIGUEZ, P.; OLIVOS, P.; HERNANDEZ, C.; GONZALEZ, J. 1984. Síndrome hemolítico urémico. *Rev. Chil. Pediatr.* 55:29-33.

CORDOVÉZ, A.; PRADO, V.; MAGGI, L.; CORDERO, J.; MARTINEZ, J.; MISRAJI, A.; RIOS, R.; SOZA, G.; OJEDA, A.; LEVINE, M. 1992. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* associated with Hemolytic-Uremic Syndrome in Chilean children. *J. Clin. Microbiol.* 2153-2157.

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.

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.

DONNENBERG, MS. 2005. Infections due to *Escherichia coli* and other [enteric](#) gram-negative bacilli. In DC Dale, DD Federman, eds., *ACP Medicine*, section 7, chap. 8. New York: WebMD.

DOYLE, MP.; ZHAO, T.; MENG, J.; ZHAO, S. 1997. *Escherichia coli* O157:H7. In: Doyle MD, Beuchat LR, Montville TJ, Eds. *Food Microbiology, Fundamentals and Frontiers*. Washington, DC: ASM Press, pp 171-191.

DUNCAN, L.; MAI, V.; CARTER, A.; CARLSON, JA.; BORCZYK, AA.; KARMALI, MA. 1986. Outbreak of gastrointestinal disease in Sarnia, Ontario. *Ontario Dis. Surv. Rep.* 7:604-11.

DYTOC, M.; SONI, R.; COCKERILL, F.; DE AZAVEDO, J.; LOUIE, M.; BRUNTON, J.; SHERMAN, P. 1993. Multiple determinants of verotoxin-producing *Escherichia coli* O157 attachment-effacement. *Infect Immun.* 61: 3382-3391.

EDELMAN, R.; KARMALI, MA.; FLEMING, PA. 1988. From the National Institutes of Health. Summary of the International Symposium and Workshop on Infections due to Verocytotoxin (Shiga-like toxin) producing *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.* 157:1102-1104.

ELLIOT, SJ.; WAINWRIGHT, LA.; MCDANIEL, TK.; JARVIS, KD.; DENG, YK.; LAI, LC.; MCNAMARA, BP.; DONNENBERG, MS.; KAPER, JB. 1998. The complete sequence of the locus of enterocyte effacement (LEE) from enteropathogenic *Escherichia coli* E2348/69. *Mol. Microbiol.* 28:1-4.

GARRIDO, P.; BLANCO, M.; MORENO-PAZ, M.; BRIONES, C.; DAHBI, G.; BLANCO, J.; BLANCO, J.; PARRO, V. 2006. STEC-EPEC oligonucleotide microarray: A new tool for typing genetic variants of the LEE pathogenicity island of human and animal Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) strains. *J. Clin. Chem.* 52:192–201.

GARMENDIA, J.; FRANKEL, G.; CREPIN, V. 2005. Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections: Translocation, Translocation, Translocation. *Infection and Immunity*. 2573-2585.

GIRALDI, R.; GUTH, B.; TRABULSI, LR. 1990. Production of Shiga-like toxin among *Escherichia coli* strains and other bacteria isolated from diarrhea in Sao Paulo. *Brazil J. Clin. Microbiol.* 28: 1460-1462.

GOLDWATER, PN.; BETTELHEIM, KA. 1998. New perspectives on the rol of *Escherichia coli* serotypes in human disease. *J. Med. Microbiol.* 47: 1039-1045.

GRIFFIN, PM.; OSTROFF, SM.; TAUXE, RV.; GREENE, KD.; WELLS, JG.; LEWIS, JH. 1988. Illnesses associated with *Escherichia coli* O157:H7 infections. A broad clinical spectrum. *Ann. Intern. Med.* 109:705-12.

GRIFFIN, PM ; TAUXE, RV. 1991. The epidemiology of infection caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli* and the associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiol. Rev.* 13: 60-98.

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.

GUTH, B.; RAMOS, S.; CERQUEIRA, A.; ANDRADE, J.; GOMES, T. 2002a. Phenotypic and genotypic characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from children in Sao Paulo, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 97: 1085-1089.

GUTH, B.; SOUZA, R.; VAZ, T.; IRINO, K. 2002b. First Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolate from a patient with hemolytic uremic syndrome. *Brazil Emerg. Infect. Dis.* 8, 535-536.

GYLES, CL. 2006. Shiga Toxin-producing *Escherichia coli*: An overview. *J. Anim. Sci.* 85:45-62.

HAMANO, S.; NAKANISHI, Y.; NARA, T.; SEKI, T.; OHTANI, T.; OISHI, T. 1993. Neurological manifestations of hemorrhagic colitis in the outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection in Japan. *Acta Paediatr.* 82:454-458.

HUSSEIN, H. 2007. Prevalence and pathogenicity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef cattle and their products. *J. Anim. Sci.* 85:63-72.

IRINO, K.; GOMES, T.; VAZ, T.; KANO, E.; KATO, M.; DIAS, M.; GONCALVES, C.; GUTH, B. 2000. Prevalence of Shigatoxin and intimin gene sequences among *Escherichia coli* of serogroups O26, O55, O111, O119 and O157 isolated in Sao Paulo, Brazil. In: Abstracts of the Fourth International Symposium and Workshop on Shigatoxin (Verocytotoxin)-Producing *Escherichia coli* Infections. Kyoto, Japan, p. 107.

JENKINS, C.; PERRY, T.; CHEAST, T.; SHAW, D.; FRANKEL, G.; DOUGAN, G.; GUNN, G.; SMITH, HR.; PATON, AW.; PATON, J.C. 2003. Distribution of the *saa* Gene in Strains of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* of Human and Bovine Origins. *J. Clin. Microbiol.* 1775-1778.

JERSE, AE.; YU, J.; TALL, BD.; KAPER, JB. 1990. A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 7839-7843.

JOHNSON RP.; WILSON, JB.; MICHEL, P.; RAHN, K.; RENWICK, SA.; GYLES, CL.; SPIKA J.S. 1999. Human infections with verocytotoxigenic *Escherichia coli* associated with exposure to farms and rural environments. In: Stewart CS, Flint HJ, Eds. *Escherichia coli* O157 in Farm Animals. Wallingford, UK: CABI Publishing, pp 147-168.

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. *Int. J. Med. Microbiol.* 294: 417-425.

KAPER, JB.; NATARO, JP.; MOBLEY, HL. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* 2:123-140.

KAPLAN, BS.; PROESMANS, W. 1987. The hemolytic-uremic syndrome of childhood and its variants. *Semin. Hematol.* 24:148-60.

KARMALI, MA. 1989. Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 2:15-38.

KOVACS, MJ.; RODDY, J.; GREGOIRE, S.; CAMERON, W.; EIDUS, L.; DROUIN, J. 1990. Thrombotic thrombocytopenic purpura following hemorrhagic colitis due to *Escherichia coli* O157:H7. *Am. J. Med.* 88:177-9.

LEOTTA, G.; MILIWEBSKY, E.; CHINEN, I.; ESPINOSA, E.; AZZOPARDI, K.; TENNANT, S.; ROBINS-BROWNE R.; RIVAS, M. 2008. Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 strains isolated from humans in Argentina, Australia and New Zealand. *BMC Microbiol.* 8:46.

LEUNG, PH.; PEIRIS, JS.; ROBINS-BROWN, RM.; BETTELHEIM, KA.; YAM, WC. 2003. A newly discovered verotoxin variant, Vt2g, produced by bovine verocytotoxigenic *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:7549-7553.

LEVINE, MM. 1987. *E. coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic and enteroadherent. *Journal Infect. Dis.* 155: 377-89.

LINGWOOD, CA. 1996. Role of verotoxin receptors in pathogenesis. *Trends Microbiol.* 4:147-153.

LOIRAT, C.; SONSINO, E.; MORENO VARGA, E.; PILLION, G.; MERCIER, F.; BEAUFILS, F.; MATHIEU, H. 1984. Hemolytic-uremic syndrome: an analysis of the natural history and prognostic features. *Acta Paediatr. Scand.* 73:505-514.

LOPEZ, EL.; DIAZ, M.; GRINSTEIN, S.; DEVOTO, S.; MENDILAHARZU, F.; MURRAY, BE. 1989. Hemolytic uremic syndrome and diarrhea in Argentine children: the role of Shiga-like toxins. *J. Infect. Dis.* 160:469-475.

LUCHESSI, P.; KRÜGER, A.; PARMA, A. 2006. Distribution of *saa* gene variants in verocytotoxigenic *Escherichia coli* isolated from cattle and food. *Res. Microbiol.* 157: 263-266.

MICHINO, H.; ARAKI, K.; MINAMI, S.; TAKAYA, S.; SAKAI, N.; MIYASAKI, M.; ONO, A.; YANAGAWA, H. 1999. Massive outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection in schoolchildren in Sakai City, Japan, associated with consumption of white radish sprouts. *Am. J. Epidemiol.* 150:787-796.

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

NICHOLLS, L.; GRANT, TH.; ROBINS-BROWNE, YRM. 2000. Identification of a novel genetic locus that is required for *in vitro* adhesion of a clinical isolate of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* to epithelial cells. *Mol. Microbiol.* 35:275-288.

O'BRIEN, AD.; KAPER, JB. 1998. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: yesterday, today and tomorrow. In: *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* strains. B. Koper and AD. O'Brien, Eds. American Society for Microbiology, Washington, D.C. pp3-11.

OSTROFF, SM.; KOBAYASHI, JM.; LEWIS, JH. 1989. Infections with *Escherichia coli* O157:H7 in Washington State. The first year of statewide disease surveillance. *JAMA*. 262:355-9.

PADOLA, NL.; SANZ, ME.; LUCHESSI, PM.; BLANCO, JE.; BLANCO, M.; ETCHEVERRIA, AJ.; ARROYO, GH.; PARMA, AE. 2002. First isolation of the enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O145:H- from cattle in feedlot in Argentina. *BMC Microbiol.* 2: 6 -9.

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

PARMA, A.; SANZ, ME.; BLANCO, JE.; BLANCO, J.; VINAS, MR.; BLANCO, M.; PADOLA, NL.; ETCHEVERRIA, AI. 2000. Virulence genotypes and serotypes of verotoxigenic *Escherichia coli* isolated from cattle and foods in Argentina. Importance in public health. *Eur. J. Epidemiol.* 16: 757-762.

PATON, AW.; RATCLIFF, RM.; DOYLE, RM.; SEYMOUR-MURRAY, J.; DAVOS, D.; LANSER, JA.; PATON, JC. 1996. Molecular microbiological investigation of an outbreak of hemolytic-uremic syndrome caused by dry fermented sausage contaminated with Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 34:1622-1627.

PATON, AW.; PATON, JC. 1999. Molecular characterization of the locus encoding biosynthesis of the lipopolysaccharide O antigen of *Escherichia coli* serotype O113. *Infect. Immun.* 67:5930-5937.

PATON, JC.; PATON, AW. 2000. Shiga toxigenic *Escherichia coli* infections. *Sci. Med.* May/June: 28-37.

PATON, AW.; SRIMANOTE, P.; WOODROW, MC.; PATON, C. 2001. Characterization of Saa, a novel autoagglutinating adhesin produced by locus of enterocyte effacement-negative Shiga-toxigenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans. *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.

PRADO, V.; CAVAGNARO, F. 2008. Síndrome hemolítico urémico asociado a infección intestinal por *Escherichia coli* productora de Shigatoxina (STEC) en pacientes chilenos: aspectos clínicos y epidemiológicos.

RIDOLFI, RL.; BELL, WR. 1981. Thrombotic thrombocytopenic purpura. Report of 25 cases and review of the literature. Medicine (Baltimore). 60:413-28.

RIGOBELLO, E.; SANTO, E., MARIN, J. 2008. Beef carcass contamination by Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* Strains in an abattoir in Brazil: Characterization and resistance to antimicrobial drugs. Foodborne Pathogens and Disease 5 (6) 811-817.

RILEY, LW.; TEMIS, RS.; HELGERSON, SD.; MCGEE, HB.; WELLS, JG.; DAVIS, BR.; HEBERT, RJ.; OLCOTT, ES.; JOHNSON, LM.; HARGRETT, NT.; BLAKE, PA.; COHEN, ML. 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. 778-781.

SAG, CHILE, DIVISIÓN DE PROTECCIÓN PECUARIA, SUBDEPARTAMENTO DE INDUSTRIA Y TECNOLOGÍA PECUARIA. 2007. Exigencias para el ingreso al programa de plantales de animales bovinos bajo certificación oficial.

SCHEUTZ, F.; T. CHEASTY.; WOODWARD, D.; SMITH, HR. 2004. Designation of O174 and O175 to temporary O groups OX3 and OX7, and six new *E. coli* O groups that include Verocytotoxin-producing *E. coli* (VTEC): O176, O177, O178, O179, O180 and O181. APMIS, 112:569-584.

SCHMIDT, H.; BEUTIN, L.; KARCH, H. 1995. Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933. Infect. Immun. 63: 1055-61.

SCHMIDT, H. 2001. Shiga-toxin-converting bacteriophages. *Eur J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 22: 726-730.

SCOTLAND, SM.; ROWE, B.; SMITH, HR.; WILLSHAW, GA.; GROSS, RJ. 1988. Vero cytotoxin-producing strains of *Escherichia coli* from children with haemolytic uraemic syndrome and their detection by specific DNA probes. *J. Med. Microbiol.* 25:237-43.

STEVENS, MP.; VAN DIEMEN, PM.; FRANKEL, G.; PHILLIPS, A.; WALLIS, TS. 2002. *Efa1* influences colonization of the bovine intestine by Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Serotypes O5 and O111. *Infection and Immunity.* 5158-5166.

STORDEUR, P.; MARLIER, D.; BLANCO, J.; OSWALD, E.; BIET, F.; DHO-MOULIN, M.; MAINIL, J. 2002. Examination of *Escherichia coli* from poultry for selected adhesion genes important in disease caused by mammalian pathogenic *E. coli*. *Vet. Microbiol.* 84: 231-241.

TARR, PI.; NEILL, MA.; CLAUSEN, CR.; WATKINS, SL.; CHRISTIE, DL.; HICKMAN, RO. 1990. *Escherichia coli* O157:H7 and the hemolytic-uremic syndrome: importance of early cultures in establishing the etiology. *J. Infect. Dis.* 162: 553-6.

TARR, PI.; BILGE, SS.; VARY JR, JC.; JELACIC, S.; HABEEB, RL.; WARD, TR.; BAYLOR, MR.; BESSER, TE. 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, B.; POSSE, B.; OSEK, J. 2005. Identification of putative adhesion genes in shigatoxigenic *Escherichia coli* isolated from different sources. *Vet. Microbiol.* 110: 77-85.

TORRES, AG.; GIRON, JA.; PERNA, NT.; BURLAND, V.; BLATTNER, FR.; AVELINO-FLORES, F.; KAPER, JB. 2002. Identification and characterization of *lpfABCC'DE*, a fimbrial operon of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect. Immun.* 70: 5416-5427.

TORRES, AG.; SLATER, TM.; PATEL, SD.; POPOV, VL.; ARENAS-HERNÁNDEZ, MM. 2008. Contribution of the Ler- and H-NS-regulated long polar fimbriae of *Escherichia coli* O157 during binding to tissue-cultured cells. *Infect. Immun.* 76:5062-5071.

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.

VIZCAYA, MC.; SANDOVAL, MP.; SALIN, P.; PRADO, V. 1996. Hemolytic-uremic síndrome impact in different metropolitan health care areas. *Rev. Chil. Infect.* 13:223-230.

WANG, JY.; WANG, SS.; YIN, PZ. 2006. Haemolytic-uraemic syndrome caused by a non-O157:H7 *Escherichia coli* strain in experimentally inoculated dogs. *J. Med. Microbiol.* 55:23-29.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). 1998. Zoonotic non-O157 Shigatoxin-producing *Escherichia coli* (STEC). In: Proceedings of the report of a WHO Scientific Working Group Meeting. World Health Organization, Geneva.

ZHANG, J.; XIA, SL; CHEN, Z.; HUANG, P.; FU, B.; TU, G. 2002. A study on acute renal failure after an outbreak of diarrhea in Suixian county, Henan province. *Chin. J. Epidemiol.* 23:105-107.

ZAMORA, J.; REINHARDT, G.; TADICH, N.; CABEZAS, X.; TIRACHINI, J.A.; FRITZ, MN. 1994. Cepas de *Escherichia coli* productoras de enterotoxina termoestable (ST) y de verotoxina (VT) aisladas de terneros y corderos con diarrea, *Arch. Med. Vet.* 26: 41-47.