



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**¿SON LOS PARQUES RECREACIONALES UNA FUENTE DE
INFECCIÓN CON *Escherichia coli* PRODUCTORA DE TOXINA
SHIGA?**

Andrea Cruz Peñaranda

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

PROFESOR GUÍA: Nicolás Galarce Gálvez
Universidad de Chile

FONDECYT Iniciación 11170363

SANTIAGO, CHILE
2021



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**¿SON LOS PARQUES RECREACIONALES UNA FUENTE DE
INFECCIÓN CON *Escherichia coli* PRODUCTORA DE TOXINA
SHIGA?**

Andrea Cruz Peñaranda

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

Nota final: _____

Firma

Profesor Guía: Dr. Nicolás Galarce
Profesor Corrector: Dra. Javiera Cornejo
Profesor Corrector: Dra. Lisette Lapierre

SANTIAGO, CHILE
2021

AGRADECIMIENTOS

Esta Memoria de Título va dedicada especialmente y con mucho cariño al Dr. Galarce, el cual confió en mis capacidades para formar parte de este maravilloso proyecto y significó un inmenso apoyo durante estos dos largos años. No puedo tampoco dejar de agradecer a mis padres, Lorena y Jorge, pilares fundamentales en mi vida que me proporcionaron las herramientas para lograr formarme a la mujer que soy hoy en día. Y finalmente a mi maravilloso marido, quien me ha proporcionado un espacio de paz, tranquilidad y amor para terminar esta etapa tan importante de mi carrera universitaria. Sin todos ustedes, nada de esto hubiese sido posible.

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mí misma, por siempre confiar en mis capacidades y nunca darme por vencida, a pesar de los constantes obstáculos que se han presentado a lo largo de mi vida. La culminación de esta Memoria de Título no hubiese sido posible sin mi incansable perseverancia y seguridad en que soy capaz de lograr todas las metas que me propongo.

ÍNDICE DE CAPÍTULOS

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	4
Generalidades de STEC	4
Factores de virulencia de STEC	5
Vías de transmisión	7
Patogenia	7
Epidemiología	9
Impacto de STEC en la salud pública	10
STEC en el medio ambiente	11
OBJETIVO GENERAL.....	14
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
Diseño	15
Muestras	15
Identificación de STEC	15
Caracterización del virulotipo	17
Expresión y análisis de los resultados	18
Normas de bioseguridad	19
RESULTADOS.....	20
DISCUSIÓN.....	22
CONCLUSIONES.....	26
BIBLIOGRAFÍA.....	27
ANEXOS.....	35

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Secuencia de los partidores utilizados para la detección de los genes *stx1* y *stx2*, tamaño del amplicón esperado, y condiciones del PCR 17

Tabla 2. Secuencia de los partidores utilizados para la detección de los genes *eae*, *exhA*, *lpfA*, y *saa*, tamaño del amplicón esperado y condiciones del PCR.....18

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Proporción de muestras de agua positivas a genes de virulencia mediante la técnica de PCR múltiplex.....21

Figura 2. Comunas de la Región Metropolitana donde se obtuvieron muestras de agua positivas a genes de virulencia pesquisados.....21

RESUMEN

Escherichia coli productora de toxina Shiga (STEC) es un patógeno emergente que representa un importante problema para la salud pública a nivel mundial, debido a su carácter zoonótico y a que su infección puede producir graves enfermedades en las personas. El cuadro más severo causado por STEC es una complicación extraintestinal sistémica potencialmente mortal conocida como síndrome hemolítico urémico (SHU), la cual afecta principalmente a niños menores de cinco años, siendo considerada la principal causa de insuficiencia renal aguda en este grupo etario. Si bien en Chile se han reportado numerosos brotes asociados a infecciones por STEC, a la fecha no contamos con estudios respecto al rol que cumple el ambiente como posible fuente de transmisión de este patotipo a las personas.

Debido a lo anterior, la presente Memoria de Título tuvo como objetivo determinar el rol que representa el agua y suelo de parques recreacionales como vehículos para la transmisión de cepas STEC con virulotipo asociado a enfermedad severa en las personas. Para cumplir con lo anterior, se analizaron 140 muestras de agua y 42 de tierra obtenidas desde siete parques pertenecientes a la Región Metropolitana, las cuales fueron recolectadas durante los meses de enero y marzo del año 2020. Así, se realizaron dos rondas de cultivo, en placas de agar MacConkey y Levine, para aislar colonias con fenotipo concordante con *E. coli*. Mediante la técnica de PCR se buscó determinar la presencia de los genes *stx1* y/o *stx2* con el fin de identificar cepas STEC en las placas, y detectar la presencia de genes de virulencia accesorios asociados a enfermedad severa en las cepas STEC aisladas, tales como el gen *eae*, *exhA*, *saa* y *lpfA*. Sin embargo, con esta metodología no fue posible el aislamiento de cepas STEC en las muestras analizadas.

En vista de los resultados obtenidos, podemos concluir que el agua y suelo de parques recreacionales en la Región Metropolitana no constituyen vehículos para la transmisión de cepas STEC con virulotipo asociado a enfermedad severa en las personas. No obstante, destaca la importancia de implementar futuros estudios en torno a esta fuente de transmisión, debido a que a la fecha este estudio constituye un primer acercamiento en esta materia, y STEC sólo recientemente se encuentra bajo vigilancia en matrices ambientales en nuestro país, por lo que no contamos con información suficiente para descartarlo.

Palabras claves: STEC; medio ambiente; agua; suelo; genes de virulencia

ABSTRACT

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) is an emerging pathogen that represents a major problem for public health worldwide, due to its zoonotic nature and because its infection can cause severe diseases in people. The most severe condition produced by STEC is a potentially life-threatening systemic extraintestinal complication known as haemolytic uremic syndrome (SHU), which mainly affects children under five of age, being considered the main cause of acute kidney failure in this age group. Although numerous outbreaks associated with STEC infections have been reported in Chile, to date we do not count with studies regarding the role of the environment as a possible transmission source of this pathotype to people.

Due to the above, the present research aimed to determine the role played by water and soil in recreational parks as vehicles for the transmission of STEC strains with virulotype associated with severe disease in people. To comply with the above, 140 water and 42 soil samples obtained from seven parks belonging to the Metropolitan Region were analyzed, which were collected during the months of January and March of the year 2020. Two rounds of culture were performed, on MacConkey and Levine agar plates, to isolate colonies with phenotype concordant with *E. coli*. Using the PCR technique, we sought to determine the presence of the *stx1* and/or *stx2* genes in order to identify STEC strains in the plates, and detect the presence of accessory virulence genes associated with severe disease in the isolated STEC strains, such as *eae*, *exhA*, *saa* and *lpfA* genes. However, with this methodology it was not possible to isolate STEC strains in the analyzed samples.

In view of the results obtained, we can conclude that water and soil of recreational parks in the Metropolitan Region do not represent vehicles for the transmission of STEC strains with virulotype associated with severe disease in people. However, it is imperative to highlight the importance of implementing future research around this transmission source, since to date this study constitutes a first approach in this matter, and STEC has only recently been under environmental surveillance in our country, therefore we do not have enough information to rule it out.

Keywords: STEC, environment; water; soil; virulence genes

INTRODUCCIÓN

Escherichia coli productora de toxina Shiga (STEC, por sus siglas en inglés) es un patógeno zoonótico emergente de gran importancia para la salud pública debido a que su infección puede producir graves enfermedades en las personas, tales como colitis hemorrágica y síndrome hemolítico urémico. El término STEC se refiere a las cepas de *E. coli* con la particularidad de producir citotoxinas denominadas toxinas Shiga (Stx), las cuales son capaces de acceder a la circulación sistémica y causar severos daños en el organismo. Asimismo, las cepas circulantes exhiben una gran variabilidad en términos de virulencia, pudiendo portar factores de virulencia accesorios, tales como adhesinas y hemolisinas, que contribuyen a la generación de enfermedad severa en las personas.

Diversas especies de animales son consideradas reservorios intestinales y diseminadores de este patotipo, siendo capaces de contaminar el ambiente a través de sus deposiciones, destacando de forma significativa su elevada persistencia en estos medios. No obstante, a la fecha no contamos con estudios en cuanto al rol que cumple el agua y suelo de los parques urbanos para la transmisión de STEC, constituyendo esta incógnita una importante preocupación debido a que son espacios frecuentemente utilizados por la población pediátrica, los cuales son considerados el grupo etario más susceptible a las graves enfermedades causadas por este patógeno.

La prevención y control de esta infección ha resultado dificultosa debido al amplio espectro de fuentes contaminantes y la limitada efectividad de las intervenciones actualmente utilizadas. Debido a la gravedad de las enfermedades asociadas a STEC, sumado a las secuelas que producen a largo plazo, éstas significan un elevado costo económico tanto para las familias afectadas como para el sistema de salud público, por lo que todos los esfuerzos deben dirigirse a la prevención de esta infección.

Considerando los antecedentes expuestos, en esta Memoria de Título se buscó caracterizar cepas STEC aisladas desde aguas y suelos de diversos parques recreacionales ubicados en la Región Metropolitana con el fin de determinar el rol que juega el ambiente como vehículo de dichas cepas, y de esta forma, desarrollar nuevas estrategias de prevención y control de este importante patógeno en nuestro país.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Generalidades de STEC

Las bacterias de la especie *Escherichia coli* corresponden a bacilos Gram negativos pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*, los cuales forman parte de la microbiota normal intestinal de animales y personas (Rivas *et al.*, 2016). No obstante, la adquisición de genes de virulencia a través de elementos genéticos móviles, tales como bacteriófagos, islas de patogenicidad y plásmidos, le ha conferido la capacidad a ciertas cepas de producir graves enfermedades a las personas y animales (Balière *et al.*, 2015), lo cual ha permitido la emergencia de nuevas cepas epidémicas con atributos hipervirulentos (Rivas *et al.*, 2016).

En función de sus factores de virulencia y mecanismos por los cuales causan enfermedad, estas cepas se han agrupado en diversos patotipos, los cuales se dividen en dos categorías: diarreogénicos y extraintestinales. Así, entre los patotipos diarreogénicos se encuentran *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* de adherencia difusa (DAEC), y *E. coli* productora de toxina Shiga (STEC) (Farfán *et al.*, 2016), siendo este último el único patotipo zoonótico (Cabal *et al.*, 2017).

STEC es un patotipo diarreogénico de *E. coli* cuyo sello distintivo radica en su capacidad de producir toxinas de la familia Shiga toxinas (Stx), las cuales constituyen sus principales factores de virulencia (Balière *et al.*, 2015), compartiendo una estructura y actividad biológica similar a la toxina Shiga producida por *Shigella dysenteriae* tipo 1 (Rivas *et al.*, 2016). Este patotipo representa una grave amenaza para la salud pública debido a que su infección es capaz de producir graves enfermedades en las personas, tales como colitis hemorrágica (CH), y una complicación extraintestinal sistémica potencialmente mortal conocida como síndrome hemolítico urémico (SHU), el cual afecta especialmente a niños menores de cinco años (Bowen y Coward, 2018) y constituye el cuadro más grave causado por STEC (Saxena *et al.*, 2015).

Las cepas de STEC son genéticamente heterogéneas y se han agrupado en distintos serotipos en torno a sus antígenos de superficie (Macori *et al.*, 2020). Si bien se reconoce que una amplia variedad de aquellos son capaces de provocar SHU, las investigaciones sobre los mecanismos patogénicos se han centrado principalmente en el serotipo O157:H7, debido que

es el causante del mayor número de brotes reportados a nivel mundial y el más frecuentemente asociado a esta enfermedad (Reynolds *et al.*, 2020). No obstante, una amplia variedad de cepas STEC no-O157 también han sido implicadas en importantes brotes, destacando entre ellas los serogrupos O26, O45, O103, O111, O121 y O145, conocidos como “Big six” (Jincai *et al.*, 2014). En este sentido, según reportes del Instituto de Salud Pública de Chile (ISP), O26:H11 es el segundo serotipo más frecuentemente aislado desde cepas de origen clínico en el país (ISP, 2017); mientras que en América del Norte se ha reportado que las cepas no-O157 son responsables de más del 50% de los casos notificados por infecciones causadas por STEC (Reynolds *et al.*, 2020).

Factores de virulencia de STEC

La característica distintiva de STEC reside en su capacidad de producir una o más Stx, toxinas que se encuentran codificadas en bacteriófagos templados, pudiendo presentar la toxina Shiga 1 (Stx1) codificada por el gen *stx1*, la toxina Shiga 2 (Stx2) codificada por el gen *stx2*, o ambas a la vez (Reynolds *et al.*, 2020). Stx es una proteína que posee una estructura AB₅, conformada por una subunidad A enzimáticamente activa unida a un pentámero de subunidades B (Silva *et al.*, 2017). En su acción celular, la subunidad B es la encargada de generar la unión física de la toxina al receptor globotriaosilceramida (Gb3), el cual se expresa principalmente en las células endoteliales vasculares del riñón, colon y cerebro, siendo de esta forma tejidos especialmente susceptibles a su acción (Mele *et al.*, 2014). Posterior a esta unión, la subunidad A - que posee acción catalítica sobre el ARN ribosomal - se internaliza en la célula mediante endocitosis y produce el cese de la síntesis proteica (Cervantes *et al.*, 2019), lo cual desencadena una respuesta de estrés ribotóxico que finalmente conduce a la muerte celular por apoptosis (Donnenberg, 2013).

Si bien ambas toxinas poseen la capacidad de causar enfermedad, estudios indican que las cepas portadoras de Stx2 son más virulentas y se asocian más frecuentemente con el desarrollo del SHU (Reynolds *et al.*, 2020). Esto debido a que si bien ambas poseen una estructura similar, Stx2 es 100 veces más citotóxica para las células endoteliales de la microvasculatura renal que Stx1, debido que la subunidad A de Stx2 posee una mayor fuerza de unión al ribosoma y mayor actividad catalítica que la subunidad A de Stx1 (Silva *et al.*, 2017). En este contexto, un estudio evidenció que el desarrollo de SHU en niños se asoció

más a cepas STEC productoras de Stx2, mientras que la mayoría de las cepas aisladas de niños con infección asintomática o cursando con diarrea autolimitada portaban cepas STEC productoras de Stx1 (Mele *et al.*, 2014).

La importancia de las Stx en el desarrollo de enfermedad severa en las personas es incuestionable. No obstante, STEC también puede portar una serie de genes accesorios que codifican para diversos factores de virulencia implicados en la patogenia de su infección, tales como adhesinas y hemolisinas (Croxen *et al.*, 2013). Así, las adhesinas cumplen un rol en la adherencia de STEC al epitelio intestinal, componente esencial del proceso patogénico. Dentro de éstas se describe a la intimina, proteína de membrana externa codificada por el gen *eae* que se encuentra localizado en una isla de patogenicidad denominada “locus de borrado de enterocito” (LEE, por sus siglas en inglés). Su acción es responsable de producir una lesión denominada de “adhesión y borrado” (A/E), la cual se caracteriza por la destrucción de las microvellosidades intestinales apicales y unión íntima de la bacteria al enterocito a través de la formación de estructuras en pedestal (Rivas *et al.*, 2016).

Si bien se describe que LEE se encuentra presente en las cepas más virulentas de STEC, su ausencia no excluye el potencial de este patotipo para causar estas graves enfermedades, dado que existe un importante número de cepas LEE-negativas que también han sido implicadas en diversos brotes a nivel mundial (Rivas *et al.*, 2016). Lo anterior revela que esta isla de patogenicidad no es el único componente responsable en su adherencia, y sugiere la presencia de otros factores de virulencia responsables de esta acción portados en otras islas de patogenicidad o plásmidos (Balière *et al.*, 2016). Así, en estas cepas el mecanismo de adhesión se puede llevar a cabo a través de la adhesina autoaglutinante de STEC (Saa), la cual se encuentra codificada por el gen *saa* localizado a nivel plasmidial (Franz *et al.*, 2015), produciendo un patrón de adherencia semilocalizado en el epitelio intestinal (Paton *et al.*, 2001). Otro importante factor de adherencia que contribuye a las primeras etapas de colonización son las fimbrias polares largas (Lpf) (Galli *et al.*, 2010), las cuales se encuentran codificadas por el gen *lpfA*, y puede encontrarse presente tanto en cepas LEE-negativas como positivas (McWilliams y Torres, 2014). Tal como se mencionó anteriormente, STEC también pueden presentar hemolisinas entre sus factores de virulencia. Así, una frecuentemente asociada al desarrollo del SHU es la enterohemolisina (EhxA),

citolisina que se encuentra codificada por el gene *ehxA* ubicado en un plásmido (Balière *et al.*, 2015). Aun cuando actúa induciendo la lisis de los eritrocitos, no se ha determinado su papel específico en la anemia hemolítica observada en los pacientes con SHU (Rivas *et al.*, 2016).

A pesar de lo anterior, no todas las cepas STEC poseen los mismos determinantes de virulencia, siendo algunas combinaciones de éstos, o virulotipos, asociados más frecuentemente a casos de enfermedad severa en las personas, describiéndose entre ellos el virulotipo *stx2/eae/ehxA* (Rivas *et al.*, 2016). Esta situación resalta la importancia de no sólo detectar Stx en las muestras analizadas, sino que con mayor relevancia caracterizar el perfil de virulencia en las cepas aisladas.

Vías de transmisión

La infección por STEC en las personas ocurre por vía fecal-oral mediante numerosas rutas de transmisión, dentro de las cuales se describe el consumo de alimentos o aguas contaminadas, contacto con animales reservorios, el ambiente, y propagación entre personas (Garvey *et al.*, 2016). En cuanto al ambiente, se ha descrito que diversas especies de animales pueden actuar como reservorios intestinales y diseminadores de este patotipo, siendo de esta forma capaces de contaminarlo a través de sus deposiciones (Balière *et al.*, 2015). No obstante, cabe destacar que este tipo de transmisión es una de las menos estudiadas, tanto a nivel nacional como internacional.

Patogenia

Una vez que STEC ingresa al organismo, la bacteria es capaz de resistir la acidez del estómago, característica que le confiere una baja dosis infectante (< 100 UFC/g) (Saxena *et al.*, 2015; Silva *et al.*, 2017), y le permite alcanzar de forma íntegra al colon, lugar específico donde se produce su adhesión (Farrokh *et al.*, 2012). La capacidad de colonizar el epitelio intestinal se considera un paso clave en la patogénesis de la enfermedad. Así, en esta primera fase participan las Lpf, las cuales se unen a proteínas de la matriz extracelular de los enterocitos, tales como la fibronectina, laminina y colágeno tipo V (McWilliams y Torres, 2014). Tras esta interacción inicial, las cepas LEE-positivas expresan genes que codifican para un sistema de secreción tipo III (T3SS), estructura en forma de aguja utilizada para transportar el receptor traslocado de intimina (Tir) al enterocito, el cual permite el anclaje de

la íntima a su membrana (Farfán *et al.*, 2016). Esta interacción culmina en señales que promueven la formación de la lesión A/E, caracterizada por la acumulación de filamentos de actina en el citoesqueleto, reorganización que forma estructuras semejantes a pedestales que acogen íntimamente a la bacteria al enterocito (Farfán y Torres, 2012). Este cambio estructural provoca la destrucción de las microvellosidades apicales del epitelio intestinal, lesión que produce la pérdida de su capacidad absorptiva, contribuyendo de esta forma a la diarrea inducida por la bacteria (Donnenberg, 2013). Por otro lado, se describe que la adhesión en cepas LEE-negativas es distinta, donde Saa produce áreas de eliminación de las microvellosidades pero sin producir la típica lesión en pedestal característica de las cepas LEE-positivas (Gyles, 2007).

Posterior a esta adhesión, STEC secreta las Stx al lumen intestinal. Actualmente no existe claridad sobre su mecanismo de transporte a través del epitelio intestinal en las personas, ya que este segmento no expresa receptores Gb3 (Farfán *et al.*, 2016). Sin embargo, se describen diversas teorías sobre como lo anterior se lleva a cabo, tales como su ingreso por macropinocitosis, vía transporte paracelular durante la transmigración de neutrófilos al foco inflamatorio, o que el daño provocado en la barrera intestinal permita su translocación, entre otros (Malyukova *et al.*, 2009; Schüller, 2011; Donnenberg, 2013; Mele *et al.*, 2014; Farfán *et al.*, 2016). Una vez traspasado el epitelio intestinal, la toxina se adhiere a receptores Gb3 expresados en las células endoteliales de la microvasculatura del colon, donde su acción patógena deriva en el cuadro de CH (Mele *et al.*, 2014).

Luego de lo anterior, la toxina ingresa al torrente sanguíneo, transportándose de esta forma hacia órganos que también expresan Gb3 (Schüller, 2011). Entre estos destaca el riñón, tejido que posee una elevada expresión de dicho receptor en las células endoteliales glomerulares de los niños (Dell'Orco *et al.*, 2005), donde producto del daño inducido por Stx se produce el SHU, entidad clínica perteneciente a la categoría de enfermedades conocidas como microangiopatías trombóticas, caracterizada por producir anemia hemolítica, trombocitopenia e insuficiencia renal aguda (IRA) (Lee *et al.*, 2016). Lo anterior se describe debido a que el daño citotóxico que ejerce la toxina sobre el endotelio glomerular produce adhesión plaquetaria a la pared de la microvasculatura, formando microtrombos que ocluyen el flujo sanguíneo renal (Donnenberg, 2013), lo que consecuentemente disminuye la tasa de

filtración glomerular (Gyles, 2007). Asimismo, esta agregación estrecha el lumen capilar, produciendo la fragmentación de los eritrocitos circulantes que posteriormente son fagocitados, proceso que se agrava por acción de ExhA, la cual induce hemólisis (Croxen *et al.*, 2013). Sumado a los efectos directos de Stx sobre el epitelio vascular renal, su acción induce una respuesta inflamatoria que promueve la liberación de citoquinas proinflamatorias, tales como IL-1, IL-6 y TNF α , describiéndose que este último aumenta la expresión de Gb3 en las células endoteliales (Rivas *et al.*, 2016). Por otro lado, cabe destacar que el sistema nervioso central (SNC) también se considera un órgano blanco para STEC, donde las lesiones microvasculares causados por su acción en regiones cerebrales vitales, tales como el tronco encefálico, son la principal causa de mortalidad aguda en pacientes infectados con STEC (Trachtman *et al.*, 2012).

Epidemiología

En nuestro país, el “Reglamento sobre notificación de enfermedades transmisibles de declaración obligatoria”, promulgado mediante el DS N° 158/2004, estableció a STEC como objeto de vigilancia obligatoria de laboratorio, lo que implica que todos los laboratorios clínicos deben enviar los aislados al ISP para confirmación microbiológica (MINSAL, 2004). Así, entre los años 2010 - 2016 se aislaron 2.196 cepas de origen clínico para confirmación microbiológica, de las cuales el 27,6% (n=606) fueron confirmadas como STEC. Cabe destacar que el 71,5% (n=43) de estas cepas provinieron de la Región Metropolitana, presentando además un comportamiento estacional con aumento en las estaciones estivales. Sumado a lo anterior, los niños entre 1 - 9 años de edad fueron identificados como los principales portadores, representando al 81,5% (n=494) del total de cepas confirmadas, lo cual adquiere relevancia considerando que son el grupo etario más susceptibles al cuadro del SHU (Bowen y Coward, 2018).

Si bien el SHU es considerado una enfermedad endémica en nuestro país, recién en el año 2020 mediante el DS N°7 se incorporó como una enfermedad de declaración obligatoria (MINSAL, 2020). En América Latina, el problema se concentra en los países del cono sur, reportándose anualmente una tasa de incidencia de 3,4, 5 y 10 - 17 casos por cada 100.000 niños menores de cinco años de edad en Chile, Uruguay y Argentina, respectivamente (Cubillos *et al.*, 2015; Rivas *et al.*, 2016; Fakhouri *et al.*, 2017). En este

contexto, la incidencia de SHU en Argentina es 5 - 10 veces mayor que en América del Norte. Se describe que lo anterior se asocia a diversos factores, tales como que el 20% de los niños en este país comienzan a consumir carne a los cinco meses de edad, y que este alimento se consume particularmente poco cocido (Mele *et al.*, 2014).

Impacto de STEC en la salud pública

La infección por STEC puede cursar de forma asintomática o asociarse a un amplio espectro de manifestaciones clínicas, las cuales varían desde cuadros diarreicos leves autolimitados hasta patologías de extrema gravedad, tales como CH y SHU (Morris *et al.*, 2016), siendo este último el cuadro más grave causado por su infección (Reynolds *et al.*, 2020).

Se describe que el SHU afecta especialmente a niños menores de cinco años (Bowen y Coward, 2018) debido a que la expresión de receptores Gb3 glomerulares disminuyen con la edad (Obrig, 2010). En nuestro país, se estima que el 15% de los niños infectados con STEC desarrolla SHU, con una tasa de letalidad cercana al 3% (Cavagnaro, 2019). Más aún, a nivel mundial es la principal causa de IRA en este grupo etario, donde aproximadamente el 18% de estos pacientes desarrolla posteriormente insuficiencia renal crónica (IRC) (Bowen y Coward, 2018). Adicionalmente, el 25% de estos pacientes presenta manifestaciones neurológicas (Mele *et al.*, 2014), tales como convulsión, edema cerebral y ceguera, complicaciones que se asocian a un aumento en la mortalidad (Spartá *et al.*, 2015). Así, en Argentina existe una mortalidad de alrededor de un 2,4% en los cuadros de SHU, siendo la mayor parte de estos debido a la injuria causada por la toxina en el SNC (Pistone *et al.*, 2006).

Actualmente no existen vacunas que prevengan esta enfermedad ni regímenes terapéuticos efectivos para interrumpir su progresión (Lee *et al.*, 2016), siendo controversial el uso de antimicrobianos debido a que se encuentran asociados con un mayor riesgo de desarrollo de SHU (Krause *et al.*, 2018). Lo anterior radica en que la lisis bacteriana a causa de la antibioticoterapia favorece la liberación de la toxina preformada, aumentando en altos niveles su cantidad en el intestino (Mele *et al.*, 2014). Estos antecedentes resaltan la necesidad de estudiar las vías de transmisión de STEC a las personas, para así disminuir el impacto de la infección con este patógeno en la salud pública mundial.

STEC en el medio ambiente

A comienzos del siglo XXI comenzaron a producirse cambios notables en la epidemiología de las infecciones humanas asociadas a STEC, notificándose cada vez más debido a exposiciones al ambiente (Fremaux *et al.*, 2008). Ciertas características de esta bacteria le permiten poseer una elevada tasa de sobrevivencia en estos medios, tales como su amplio rango de tolerancia a la temperatura (7 – 45°C), acidez (pH 3,8 – 9,5), actividad de agua (0,95) y ambientes anaerobios (Roberts *et al.*, 1996; Desmarchelier y Fegan, 2003). Asimismo, bajo condiciones ambientales inhóspitas STEC adopta un estado viable no cultivable (VBNC) como estrategia de supervivencia, lo cual aumenta su capacidad de perdurar en el ambiente durante largos periodos bajo situaciones ambientales y nutricionalmente estresantes (Chekabab *et al.*, 2013).

Si bien los rumiantes, en particular los bovinos, son considerados los principales reservorios de STEC (Gyles, 2007), siendo el consumo de carne insuficientemente cocida y leche no pasteurizada los vehículos de transmisión más comúnmente reportados en los brotes a nivel mundial (Vendramin *et al.*, 2014; Heiman *et al.*, 2015), diversas especies de animales que habitan espacios urbanos - tales como aves, roedores, conejos, perros y gatos - pueden actuar como reservorios intestinales asintomáticos y diseminadores de este patotipo, siendo de esta forma capaces de contaminar el ambiente a través de sus deposiciones, constituyendo un riesgo para la población que entra en contacto con estos medios (Bentancor *et al.*, 2007; Crivelli *et al.*, 2012; Murakami *et al.*, 2014; Persad y Lejeune, 2014; Crook y Senior, 2017). Debido a que tanto los animales como personas son capaces de contaminar dichos espacios con esta bacteria (Reynolds *et al.*, 2020), lo anterior plantea una grave problemática en torno a la identificación de la fuente concreta de contaminación, lo que sin duda dificulta la implementación de medidas preventivas efectivas para evitar la infección a través de estos vehículos (Bentancor *et al.*, 2007).

En cuanto a la transmisión de STEC producto del contacto con aguas contaminadas, en el año 1989 este patotipo fue reconocido como agente etiológico causante de brotes asociados a esta vía de transmisión (McGowan *et al.*, 1989). Desde entonces, diversos estudios han reportado su presencia en fuentes de aguas naturales, tales como lagos, ríos y arroyos (Cabral, 2010), siendo capaz de sobrevivir en ellos por hasta dos meses (Avery *et al.*,

2008). Así, entre los años 2011 - 2013, Cooley *et al.* (2014) analizaron la presencia de cepas STEC en 1.386 muestras de agua provenientes de lagos, ríos y arroyos en la costa central de California, EE.UU. Así, la prevalencia para STEC O157 y no-O157 fue de un 8% (n=111) y 11% (n=152), respectivamente; y de las 578 cepas aisladas, el 57% (n=330) portaba los genes *stx1* y/o *stx2* y *eae*. Asimismo, entre los años 2012 - 2013, Nadya *et al.* (2016) evaluaron la prevalencia de STEC en cuencas hidrográficas de Canadá, donde de las 330 muestras obtenidas, la prevalencia fue de un 19% (n=63). Posteriormente se aislaron 47 cepas, donde en el 83% de ellas se detectó el gen *stx1* (n=39), 53% *stx2* (n=25), 35% *stx1/stx2* (n=16), y 39% *eae* (n=18).

En este contexto, y sumado a su baja dosis infectante, la presencia de STEC en aguas ambientales plantea un elevado riesgo para la población, ya que estas tienden a ser utilizadas como fuentes recreativas (Cho *et al.*, 2018), aumentando de esta forma la emergencia de brotes asociados a ellos. Así, en el año 1991, en EE.UU se reportó un brote por STEC O157:H7 en un parque en Oregón, donde 21 niños presentaron CH y tres SHU luego de nadar en un lago de aquel parque, donde se concluyó que la fuente de contaminación de éste fueron heces de personas portadoras de este patotipo (Keene *et al.*, 1994). Asimismo, entre los años 2003 - 2012, en el mismo país se notificaron un total de 390 brotes por STEC, donde siete de ellos fueron atribuidos a fuentes de aguas ambientales (Heiman *et al.*, 2015). Uno de los brotes más recientes de infección por STEC asociados al ambiente se reportó el año 2016 en el mismo país, donde tres niños desarrollaron CH y uno SHU después de haber nadado en un arroyo ubicado en un parque, en el cual se estableció que la fuente de contaminación de éste fueron heces de ciervos (Probert *et al.*, 2017).

Por otra parte, el suelo es considerado otra fuente ambiental relevante para su transmisión, debido a que STEC es capaz de permanecer viable en estos medios durante más de tres meses (Bolton *et al.*, 1999). Así, diversos estudios han determinado que su tiempo de sobrevivencia depende de diversos factores bióticos y abióticos, correlacionándose un mayor tiempo de viabilidad en suelos arcillosos, neutros (pH > 6,5), con elevada disponibilidad de nutrientes (carbono orgánico, fósforo y nitrógeno) y menor diversidad microbiana circundante, así como también a las estaciones más cálidas del año (Bolton *et al.*, 2011; Jincal *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2013).

En término de brotes de infección por STEC asociados al suelo, en el año 2000 en Escocia, 20 scouts desarrollaron CH debido a que el área utilizada para el campamento había sido previamente pastada por 300 ovejas, donde posteriores investigaciones determinaron que 17 de ellas eran positivas a STEC O157:H7, recuperándose cepas viables en el suelo por hasta 15 semanas después de la exposición (Howie *et al.*, 2003). Asimismo, en el año 2003, en Austria dos niños desarrollaron CH y SHU, detectándose posteriormente los genes *stx1*, *stx2* y *eae* en sus deposiciones. Se planteó que la fuente de infección fue el contacto con heces de vacas positivas a STEC, las cuales posterior a fuertes lluvias fueron lavadas desde una producción bovina cercana a un bosque que días previos los niños habían visitado (Grif *et al.*, 2005).

Si bien el ambiente se reconoce cada vez más como una importante vía de transmisión para este patotipo (Bolton *et al.*, 2011), en nuestro país recién en el año 2020 mediante el DS N°7 se estableció la vigilancia de *E. coli* diarreogénicas en matrices ambientales (MINSAL, 2020), por lo que a la fecha no contamos con estudios disponibles sobre la presencia de STEC en medios urbanos, lo que sin duda representa un riesgo para la salud pública nacional.

Debido a los antecedentes ya expuestos, esta Memoria de Título tuvo como objetivo detectar cepas STEC desde aguas y suelos de parques recreacionales en la Región Metropolitana, y caracterizar su virulotipo. De esta forma, se pretendió determinar el rol del ambiente en la epidemiología de la infección con este patógeno, para así poder establecer medidas de prevención adecuadas para disminuir su impacto en la salud pública nacional.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la participación de aguas y suelos de diferentes parques recreacionales en la Región Metropolitana como vehículos de cepas STEC con virulotipo asociado a enfermedad severa en las personas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar la presencia de cepas STEC en aguas y suelos de diversos parques en la Región Metropolitana.
2. Determinar la presencia de los genes de virulencia *eae*, *ehxA*, *saa*, y *lpfA* en las cepas STEC aisladas desde muestras de aguas y suelos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño

Se realizó un estudio observacional descriptivo sobre la presencia de STEC en aguas y suelos de siete parques en la Región Metropolitana, determinando la portación de los genes de virulencia *eae*, *ehxA*, *saa*, y *lpfA*. Los parques incluyeron al Parque Bicentenario (ubicado en la comuna de Vitacura), Plaza de la Aviación (ubicado en la comuna de Providencia), Parque Bustamante (ubicado en la comuna de Providencia), Mundo Granja (ubicado en la comuna de La Pintana), Parque Quinta Normal (ubicado en la comuna de Quinta Normal), Plaza de Armas (ubicado en la comuna de Santiago), y Parque Forestal (ubicado en la comuna de Santiago). El estudio fue realizado en el Laboratorio de Microbiología Clínica Veterinaria, perteneciente al Departamento de Medicina Preventiva Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile (FAVET), financiado por el Proyecto FONDECYT de Iniciación N° 11170363.

Muestras

Se recolectaron 140 muestras de agua y 42 muestras de tierra obtenidas desde los parques anteriormente mencionados en los meses de enero y marzo del año 2020. Desde cada parque, la recolección consideró tres muestras de tierra de 25 g cada una, y una muestra de agua de 20 L. Las muestras de tierra fueron recolectadas con palas previamente desinfectadas y colocadas en bolsas plásticas estériles, y las muestras de agua recolectadas en bidones previamente desinfectados desde piletas o lagunas. Los bidones fueron posteriormente procesados en el ISP, donde se les realizó una ultrafiltración para obtener un concentrado por muestra. Finalmente, cada concentrado fue posteriormente reconstituido en 10 muestras de agua de 25 mL cada una. Una vez obtenidas las muestras, estas fueron transportadas a temperatura ambiente hasta el laboratorio donde fueron procesadas.

Identificación de STEC

Las muestras de tierra se procesaron de acuerdo al protocolo de Mukherjee *et al.* (2006), y las de agua según los protocolos de Balière *et al.* (2015) y Hill *et al.* (2005). En cuanto a las muestras de agua, éstas se sometieron al proceso de ultrafiltración descrito por Hill *et al.* (2005) como técnica para concentración de las muestras, y se modificó el caldo de pre-enriquecimiento descrito por Balière *et al.* (2015) con el fin de utilizar un caldo selectivo.

Así, cada muestra fue depositada en una bolsa plástica estéril con filtro (Bagfilter®) a la cual se le adicionaron 225 mL de caldo de pre-enriquecimiento EC con MUG (Oxoid®), para luego homogeneizarlas en un homogeneizador-triturador (Stomacher® 400 Ciculator) a 230 rpm durante 1 min. Posteriormente, las muestras fueron incubadas a 37°C durante 18-24 h. Luego de esta incubación, se sembraron 50 µL del pre-enriquecido en placas de agar MacConkey (Oxoid®) mediante la técnica de agotamiento, las cuales se incubaron a 42°C por 18-24 h.

Para determinar la presencia de genes *stx* en dichos cultivos, se llevó a cabo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para ello, a partir de cada placa se obtuvo un inóculo desde el área de crecimiento bacteriano confluyente, el cual fue resuspendido en un tubo de microcentrífuga estéril con 500 µL de agua libre de nucleasas. Los tubos se homogenizaron en vórtex, luego fueron incubados en un baño termostático (Aquabath® 1800) a 100°C durante 15 min, y posteriormente centrifugados (OrtoAlresa® Dirigen 21) a 16.500 rpm durante 5 min. El sobrenadante obtenido fue transferido a otro tubo de microcentrífuga estéril para ser utilizado como templado en la reacción de PCR multiplex utilizando un termociclador LifeECO®, de acuerdo al protocolo de Cebula *et al.* (1995), utilizando como control positivo la cepa STEC/97 previamente caracterizada por Borie *et al.* (1997). La Tabla 1 muestra las secuencias de los partidores utilizados para la detección de dichos genes, el tamaño del amplicón esperado, y condiciones del PCR.

Una vez finalizado el PCR, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2% con buffer tris acetato EDTA (TAE, PureExtreme®) a 90 V durante 45 min. Con el fin de visualizar los amplicones, se adicionaron 6 µL de SafeView Plus™ 0,02%. Se cargaron los pocillos con 5 µL del amplificado, utilizando también un marcador de tamaño molecular (Maestrogen®) con fragmentos de ADN entre 100 a 3.000 pares de bases (pb). Finalmente, las bandas obtenidas fueron visualizadas mediante un transiluminador LED (Maestrogen®) y fotografiadas para su registro.

Tabla 1. Secuencia de los partidores utilizados para la detección de los genes *stx1* y *stx2*, tamaño del amplicón esperado, y condiciones del PCR.

Gen	Secuencias de partidores (5' - 3')	Tamaño amplicón (pb)	Condiciones del PCR
<i>stx1</i>	F:CAGTTAATGTGGTGGCGAAGG R:CACCAGACAATGTAACCGCTG	348	Consistió en 35 ciclos: Denaturación: 1,5 min a 94°C Hibridación: 1,5 min a 64°C Elongación: 1,5 min a 72°C
<i>stx2</i>	F:ATCCTATTCCCGGGAGTTTACG R:GCGTCATCGTATACACAGGAGC	584	

F: forward; R: reverse.

En cuanto a las muestras positivas al PCR, y para identificar a su vez las colonias portadoras de los genes *stx* detectados, se seleccionaron hasta 30 colonias (EU-RL VTEC, 2012) aisladas desde cada placa original con fenotipo compatible con *E. coli* (desarrollo de colonias rosadas con fermentación de lactosa indicada por un halo rosa brillante y precipitación de bilis a su alrededor) para ser sembradas nuevamente de forma individual en placas de agar eosina azul de metileno (EMB) e incubadas a 42°C por 18-24 h. Las colonias aisladas fueron analizadas mediante un PCR multiplex según el procedimiento descrito anteriormente, con el fin de identificar las colonias específicas de las muestras positivas a genes *stx*. Cuando esto no fue posible, el aislamiento se repitió desde la zona de crecimiento confluyente. Las colonias identificadas como positivas a la presencia de los genes *stx* fueron sometidas a identificación bacteriana utilizando el sistema VITEK®2 (bioMérieux) y la tarjeta GN VITEK®2, de acuerdo con las instrucciones del fabricante, para confirmar las cepas como *E. coli*. Así, las colonias identificadas como *E. coli* y portando los genes *stx* fueron catalogadas como STEC.

Caracterización del virulotipo

Las colonias confirmadas como STEC fueron sometidas a PCR convencional con el fin de determinar la presencia de los genes de virulencia *eae*, *ehxA*, *lpfA*, y *saa*, siguiendo los protocolos de Vidal *et al.* (2004), Paton y Paton (1998), Vidal *et al.* (2007), y Paton y Paton (2002), respectivamente. Para ello se preparó una mezcla de reacción con 12 µL de Master Mix, 5 µL de cada partidor (10µM cada uno) y 5 µL del ADN templado previamente extraído. Luego, para la observación de los amplicones se realizó una electroforesis siguiendo el mismo protocolo descrito anteriormente. Como control positivo para los genes *eae* y *ehxA* se utilizó la cepa STEC/97, mientras que para los genes *lpfA* y *saa* se utilizaron otras cepas

STEC previamente caracterizadas (Galarce *et al.*, 2019). La Tabla 2 muestra las secuencias de los partidores utilizados para la detección de dichos genes, el tamaño del amplicón esperado, y condiciones de PCR.

Tabla 2. Secuencia de los partidores utilizados para la detección de los genes *eae*, *exhA*, *lpfA*, y *saa*, tamaño del amplicón esperado y condiciones del PCR.

Gen	Secuencias de partidores (5'-3')	Tamaño amplicón (pb)	Condiciones del PCR
<i>eae</i>	F:TCAATGCAGTTCGTTATCAGTT R:GTAAAGTCCGTTACCCCAACCTG	482	Consistió en 35 ciclos: Denaturación: 1,5 min a 94°C Hibridación: 1,5 min a 64°C Elongación: 1,5 min a 72°C
<i>exhA</i>	F:GCATCATCAAGCGTACGTTCC R:AATGAGCCAAGCTGGTTAAGCT	534	Consistió en 35 ciclos: Denaturación: 1 min a 95°C Hibridación: 2 min a 65°C (primeros 10 ciclos), y luego a 60°C Elongación: 1,5 min a 72°C
<i>lpfA</i>	F:CCTTGCGTACTGTCCGTTGA R:AGCGACCAGGGTATTGCTGT	276	Consistió en 35 ciclos: Denaturación: 1,5 min a 94°C Hibridación: 1,5 min a 64°C Elongación: 1,5 min a 72°C
<i>saa</i>	F:CGTGATGAACAGGCTATTGC R:ATGGACATGCCTGTGGCAAC	119	Consistió en 35 ciclos: Denaturación: 1 min a 95°C Hibridación: 2 min a 65°C (primeros 10 ciclos), y luego a 60°C Elongación: 1,5 min a 72°C

F: forward; R: reverse.

Expresión y análisis de los resultados

Los datos obtenidos fueron ingresados a una tabla en Microsoft Excel[®], donde se registró si las muestras resultaron positivas o negativas para los genes de virulencia *stx1* y/o *stx2*, presencia de cepas de STEC, especificando además si las cepas STEC aisladas portaban genes de virulencia accesorios. Los resultados se expresaron en cuanto al porcentaje de cepas STEC aisladas en cada parque y en la totalidad de ellos, y en cuanto a la distribución de los genes de virulencia en esas cepas.

Normas de bioseguridad

Para la correcta realización del estudio se trabajó en un laboratorio con nivel II de bioseguridad según el Manual de Normas de Bioseguridad de CONICYT (Chiong *et al*, 2018), ya que STEC es considerado un patógeno de riesgo intermedio. De esta forma se siguieron una serie de medidas de bioseguridad, tales como el uso obligatorio de delantal y guantes dentro del laboratorio, calzado cerrado, pantalones largos, lavado de manos, y correcta manipulación de los instrumentos utilizados, entre otros. Además, todos los desechos contaminados fueron autoclavados antes de ser eliminados. De igual forma, este proyecto cuenta con un certificado de bioseguridad emitido por el Comité de Bioseguridad de FAVET (Anexo 1).

RESULTADOS

Durante los meses de enero y marzo del año 2020 se recolectó un total de 140 muestras de agua y 42 muestras de tierra obtenidas desde piletas o lagunas y suelos de siete parques en la Región Metropolitana. Una vez sembradas las muestras en placas de agar MacConkey, la totalidad presentó crecimiento bacteriano compatible con enterobacterias fermentadoras de lactosa.

Considerando las condiciones similares de PCR para los genes *stx1*, *stx2* y *eae*, se realizó un PCR multiplex de las muestras que incluyó estos tres genes de virulencia en la primera fase de *screening*. En cuanto a las muestras de suelo, la totalidad resultó negativa a la presencia de los genes *stx1*, *stx2* y *eae*. No obstante, si bien el 91,5% (n=128) de las muestras de agua resultaron negativas a la pesquisa de los genes asociados a STEC, en el 5,7% de ellas se detectaron los genes *stx1+eae* (n=8), 0,7% sólo *stx2* (n=1), y 2,1% sólo *eae* (n=3) (Figura 1). Las muestras positivas a *stx1+eae* y sólo *stx2* pertenecían a muestras obtenidas del Parque Forestal (n=9) (ubicado en la comuna de Santiago), y la totalidad de las muestras positivas a sólo *eae* pertenecían a muestras obtenidas del Parque Bicentenario (n=2) (ubicado en la comuna de Vitacura) y Parque de la Aviación (n=1) (ubicado en la comuna de Providencia) (Figura 2).

Si bien lo anterior, al realizar la resiembra de las colonias aisladas en placas de agar EMB, mediante la técnica de PCR no fue posible recuperar ninguna que portara dichos genes. Así, al no contar con muestras positivas a STEC, no fue posible continuar con la fase de caracterización del virulotipo.

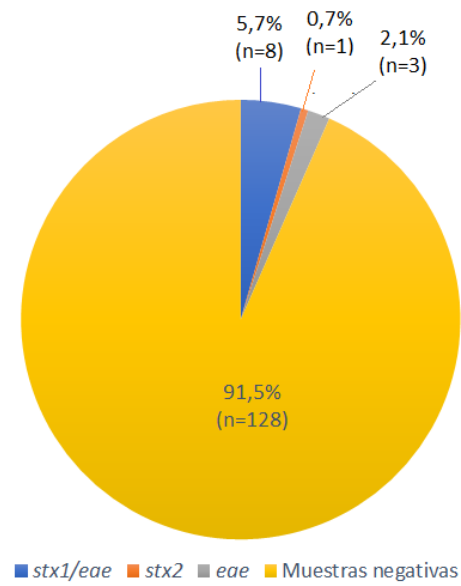


Figura 1. Proporción de muestras de agua positivas a genes de virulencia mediante la técnica de PCR múltiplex.

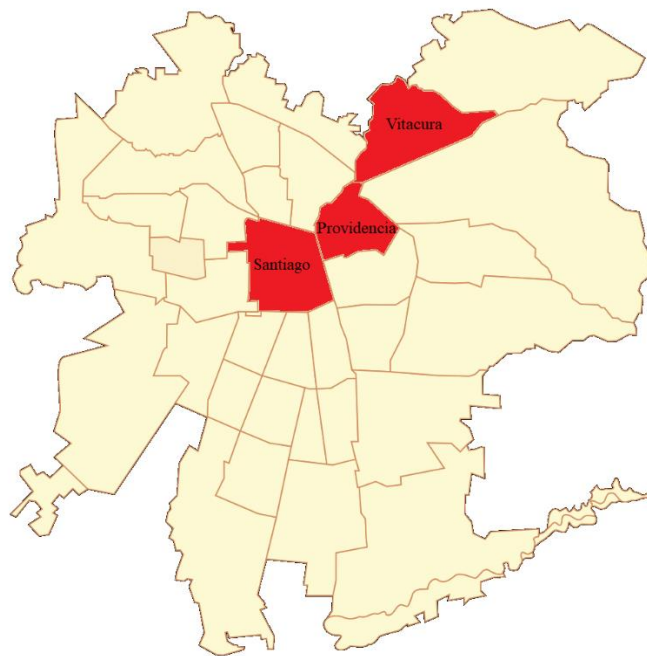


Figura 2. Comunas de la Región Metropolitana donde se obtuvieron muestras de agua positivas a genes de virulencia pesquisados.

DISCUSIÓN

En la Región Metropolitana existen diversos parques recreacionales que son utilizados por la comunidad durante todo el año, sobre todo por menores de edad, y con un aumento significativo en las estaciones estivales. Los parques analizados en este estudio constituyen algunos de los más visitados y accesibles por la población local, así como también albergan una amplia variedad de fauna silvestre, y donde diariamente transitan mascotas domésticas, especies en las cuales se ha reportado portación de este patotipo de *E. coli*. Cabe destacar que si bien diversos estudios a nivel mundial han demostrado la presencia de STEC en el ambiente, a la fecha no existen reportes en torno a su detección en estos espacios urbanos, lo cual plantea la incógnita en cuanto a si efectivamente los parques constituyen áreas relevantes para su transmisión.

Si bien en ninguna de las muestras de suelo y sólo el 6,4% (n=9) de las muestras de agua analizadas en el presente estudio resultaron positivas a la presencia de genes *stx1* y/o *stx2*, en las fases posteriores no fue posible aislar ninguna cepa STEC. Johannessen *et al.* (2015) obtuvieron similares resultados luego de analizar 80 muestras de suelo obtenidas desde cuatro granjas productoras de frutilla en Noruega y 16 muestras de agua obtenidas desde ríos y lagos utilizados para su riesgo, donde si bien el 1,25% (n=1) y 62,5% (n=10) de aquellas resultaron positivas a genes *stx1* y/o *stx2* y *eae*, respectivamente, posteriormente no lograron aislar cepas STEC. Similares resultados fueron obtenidos por Holvoet *et al.* (2015), los cuales luego de analizar 96 muestras de suelo obtenidas desde invernaderos de dos granjas productoras de lechuga en Bélgica (48 muestras de cada granja) obtuvieron un 4,2% (n=4) de positividad a genes *stx1* y/o *stx2* en cada invernadero, pero posteriormente tampoco lograron aislar cepas STEC. En cuanto a lo anterior, según Macori *et al.* (2020) los métodos moleculares pueden revelar la presencia de patógenos en las muestras mediante la detección de genes de virulencia específicos, pero a menudo su posterior aislamiento se dificulta, fenómeno que puede relacionarse a una baja concentración bacteriana en las muestras o presencia de bacterias en estado viable no cultivable (VBNC), lo cual complejiza su posterior recuperación. Para disminuir la probabilidad de generar dichas condicionantes y aumentar la sensibilidad de la técnica, en el presente estudio se realizó una etapa de pre-enriquecimiento selectivo con el objetivo de favorecer el crecimiento de STEC en las muestras con posible

baja carga bacteriana inicial (Del Cogliano, 2019), e incubación de las muestras a 37°C para permitir resucitar las bacterias en VBNC (Tamagnini y Paraje, 2015).

Otro factor que pudo dar cuenta de los resultados obtenidos en esta Memoria de Título fue la presencia de sustancias inhibitoras de la PCR en las muestras. Si bien esta técnica molecular posee una alta especificidad y sensibilidad, es propensa a alterarse producto de estas sustancias, las cuales disminuyen su sensibilidad e incluso dan lugar a resultados falsos negativos (Schrader *et al.*, 2012). Así, en las muestras ambientales es común encontrar ácido húmico, metales (tales como hierro y aluminio) y polifenoles, reconociéndose que el ácido húmico inhibe la unión de la Taq polimerasa al ADN, los metales reducen la especificidad de los partidores, y los polifenoles degradan dicha enzima (Abbaszadegan *et al.*, 1993; Abbaszadegan *et al.*, 1999). No obstante lo anterior, esta posible limitante se vio considerablemente reducida al utilizar el proceso de ultrafiltración en las muestras de agua (Ijzerman *et al.*, 1997), uso de caldo de pre-enriquecimiento que además permite diluir los posibles inhibidores presentes en las muestras (Scipioni *et al.*, 2008), así como también a la implementación de controles negativo, positivo y de reactivos (Parshionikar *et al.*, 2004), indicando que la técnica utilizada fue correctamente implementada.

Cabe mencionar que el hallazgo de muestras positivas a genes *stx* pudo deberse a diversas situaciones, tales como la presencia de *Shigella dysenteriae* tipo 1, *Enterobacter cloacale* o *Citrobacter freundii*, enterobacterias que también pueden portar este gen de virulencia (Herold *et al.*, 2004) y que efectivamente han sido aisladas en cursos de agua, con porcentajes de prevalencia de un 22,%, 5,5% y 1,8%, respectivamente (Samad *et al.*, 2018; Camacho *et al.*, 2019). Asimismo, en este medio también es posible encontrar bacteriófagos portadores de genes *stx* (Muniesa, 1998), pudiendo de esta forma haber influido en los resultados positivos al PCR pero negativos a su posterior cultivo (Macori *et al.*, 2020).

A diferencia de los resultados obtenidos en esta Memoria de Título, estudios internacionales sí han logrado aislar cepas STEC desde muestras ambientales. De esta forma, en el estudio realizado por Holvoet *et al.* (2015) anteriormente citado, los cuales de forma paralela analizaron 165 muestras de agua obtenidas desde cinco pozos y estanques (33 muestras de cada uno) utilizados para el riego de cuatro granjas productoras de lechuga a campo abierto en Bélgica, reportaron una tasa de detección de genes *stx1* y/o *stx2* en el 15,2%

de las muestras obtenidas de cada granja, aislando una cepa STEC O26 en una granja y otra del serogrupo O111 en otra granja. Huang *et al.* (2016) reportaron una similar tasa de detección luego de analizar 383 muestras obtenidas desde fuentes de aguas naturales en Taiwán, encontrando una prevalencia de 3,6% para STEC (n=14), siendo la mayor parte de aquellas obtenidas durante las estaciones de primavera y verano (n=11). Por otra parte, resultados sustancialmente mayores fueron obtenidos por Delbeke *et al.* (2015), quienes luego de analizar 78 muestras de aguas provenientes de pozos y estanques utilizados para el riego de seis granjas productoras de frutillas en Bélgica, obtuvieron una prevalencia para STEC de 14,1% (n=11), donde posteriormente dos cepas fueron aisladas, ambas pertenecientes al serogrupo O26 con virulotipo *stx1+eae*.

En cuanto a la matriz suelo, Holvoet *et al.* (2015) también analizaron 132 muestras de suelo obtenidas desde las cuatro granjas productoras de lechuga a campo abierto, encontrando una prevalencia para STEC de 3% (n=4), donde las cepas aisladas correspondieron al serogrupo O157 con virulotipo *stx2+eae*, O103 con virulotipo *stx1+stx2+eae*, y una muestra positiva a O157 y O26, portadoras del virulotipo *stx1+stx2+eae* y *stx1+eae*, respectivamente. Similares resultados fueron obtenidos en el mismo estudio realizado por Delbeke *et al.* (2015), quienes también analizaron 24 muestras de suelo obtenidas desde las inmediaciones de las granjas, los cuales encontraron una prevalencia para STEC de 8,3% (n=2), donde de las dos cepas aisladas, una portaba el virulotipo *stx1+eae* y otra *stx1+stx2+eae*, ambas pertenecientes al serogrupo O26, coincidiendo estos resultados con los obtenidos desde muestras de heces de bovinos que se encontraban pastando en las cercanías de los cultivos. Es así como estos antecedentes recalcan la capacidad de estas matrices de actuar como vehículos de cepas de STEC con virulotipo asociado a enfermedad severa en las personas.

Por otra parte, la inclusión del gen *eae* en la primera fase de *screening* permitió obtener resultados interesantes, destacando su presencia en el 2,1% de las muestras de agua. Este hallazgo pudo corresponder a la presencia de EPEC, ya que es uno de los principales factores de virulencia de este patotipo de *E. coli* (Beutin *et al.*, 2009). Tal evidencia fue reportada por Martínez *et al.* (2013), quienes luego de analizar 150 muestras de agua obtenidas desde el Río San Pedro en México, reportaron la presencia de dicho patotipo en el

6,6% (n=10) de las muestras analizadas. Esto recalca el rol de las matrices ambientales como vehículos de enteropatógenos de riesgo para la salud pública, reforzando la necesidad de establecer medidas de prevención adecuadas, tales como desinfección de aguas y educación a los visitantes de los parques sobre las medidas de higiene y seguridad que deben adoptar.

Considerando que STEC es un patotipo de *E. coli* con gran impacto en la salud pública, resulta imperante destacar la importancia de realizar futuras investigaciones en cuanto a su detección en los espacios públicos, los cuales consideren un mayor tamaño muestral, mayor número de parques muestreados, utilización de protocolos específicos para una toma de muestra representativa de suelos, así como también abarcar otras regiones de nuestro país, y de esta forma dilucidar de forma más certera si estas matrices representan un riesgo epidemiológico urbano para la transmisión de STEC. Asimismo, y debido que hasta la fecha no existe un procedimiento específico para tratar las infecciones por STEC y disminuir la progresión del SHU, limitándose ésta principalmente a terapias de soporte, sumado a la vasta cantidad de especies de animales que pueden albergar STEC y contaminar el medio ambiente, resalta la importancia de abarcar esta problemática desde su raíz, implementando espacios educativos para la población en torno a los riesgos que suponen estas matrices para la transmisión de este patógeno, y de esta forma, dirigir el enfoque a acciones estratégicas en la prevención de estas graves enfermedades.

CONCLUSIONES

En el presente estudio no se logró identificar la presencia de cepas STEC en muestras de agua y suelo de diversos parques recreacionales en la Región Metropolitana, por lo que no fue posible determinar la presencia de los restantes genes de virulencia accesorios asociados a este patotipo. En torno a estos resultados, es posible concluir que las aguas y suelos de estos parques en la Región Metropolitana no constituirían vehículos para la transmisión de cepas STEC con virulotipo asociado a enfermedad severa en las personas.

Este estudio constituye el primer precedente a nivel nacional en cuanto al rol que cumplen estas matrices en los parques urbanos como vehículos para cepas STEC, por lo que proporciona un marco referencial con información científica actualizada para futuras investigaciones en dicha materia.

BIBLIOGRAFÍA

- **ABBASZADEGAN, M.; HUBER, M.; BERBA, C.; PEPPER, L.** 1993. Detection of enteroviruses in groundwater with the polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol.* 59:1318-24.
- **ABBASZADEGAN, M.; STEWART, P.; LECHEVALLIER, M.** 1999. A strategy for detection of viruses in groundwater by PCR. *Appl Environ Microbiol.* 65:444-49.
- **AVERY, L.; WILLIAMS, A.; KILLHAM, K.; JONES, D.** 2008. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in waters from lakes, rivers, puddles, and animal-drinking troughs. *Sci Total Environ.* 389:378-85.
- **BALIÉRE, C.; RINCÉ, A.; BLANCO, J.; DAHBI, G.; HAREL, J.; VOGELEER, P.; GIARD, J.; MARIANI-KURKDJIAN, P.; GOURMELON, M.** 2015. Prevalence and characterization of Shiga toxin-producing and enteropathogenic *Escherichia coli* in shellfish-harvesting areas and their watersheds. *Front Microbiol.* 6:1356.
- **BALIÉRE, C.; RINCÉ, A.; DELANNOY, S.; FACH, P.; GOURMELON, M.** 2016. Molecular profiling of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and enteropathogenic *E. coli* strains isolated from French coastal environments. *Appl Environ Microbiol.* 82(13):3913-27.
- **BENTANCOR, A.; RUMI, M.; GENTILINI, M.; SARDOY, C.; IRINO, K.; AGOSTINI, A.; CATALDI, A.** 2007. Shiga toxin-producing and attaching and effacing *Escherichia coli* in cats and dogs in a high hemolytic uremic syndrome incidence region in Argentina. *FEMS Microbiol Lett.* 267(2):251-56.
- **BEUTIN, L.; JAHN, S.; FACH, P.** 2009. Evaluation of the “GeneDisc” real-time PCR system for detection of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O26, O103, O111, O145 and O157 strain according to their virulence markers and their O- and H- antigen-associated genes. *J Appl Microbiol.* 106:1122-32.
- **BOLTON, D.; BYRNE, C.; SHERIDAN, J.; MCDOWELL, D.; BLAIR, I.** 1999. The survival characteristics of a non-toxigenic strain of *Escherichia coli* O157:H7. *J Appl Microbiol.* 86:407-11.
- **BOLTON, D.; BONAGHAN, A.; BYRNE, C.; FANNING, S.; SWEENEY, T.; MCDOWELL, D.** 2011. Incidence and survival of non-O157 verocytotoxigenic *Escherichia coli* in soil. *J Appl Microbiol.* 111:484-90.
- **BORIE, C.; MONREAL, Z.; GUERRERO, P.; SANCHEZ, M.; MARTINEZ, J.; ARELLANO, C.; PRADO, V.** 1997. Prevalencia y caracterización de *Escherichia coli* enterohemorrágica aisladas de bovinos y cerdos sanos faenados en Santiago, Chile. *Arch Med Vet.* 29(2):205-12.
- **BOWEN, E.; COWARD, R.** 2018. Advances in our understanding of the pathogenesis of hemolytic uremic syndrome. *Am J Physiol Renal Physiol.* 314: F454-61.

- **CABAL, A.; VICENTE, J.; ÁLVAREZ, J.; BARASONA, J.; BOADELLA, M.; DOMINGUEZ, L.; GORTAZAR, C.** 2017. Human influence and biotic homogenization drive the distribution of *Escherichia coli* virulence genes in natural habitats. *MicrobiologyOpen*. 6(e):e00445.
- **CABRAL, J.** 2010. Water microbiology: Bacterial pathogens and water. *Int J Environ Res Public Health*. 7(10):3657- 3703.
- **CAMACHO, J.; ESCOBAR, M.; ANGULO, R.; ROCHA, J.; ROJAS, L.** 2019. Calidad microbiológica de los sistemas de agua de consumo humano en el municipio de Colcapirhua. *Re Ci Sa UNI*. 6(1):8-14.
- **CAVAGNARO, F.** 2019. Síndrome hemolítico urémico asociado a Shiga toxina: ¿Como prevenirlo?. *Rev Chil Pediatr*. 90(2):139-44.
- **CEBULA, T.; PAYNE, W.; 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):248-50.
- **CERVANTES, I.; DURÁN, MARÍA DEL PILAR.; VILLALOBOS, D.** 2019. Síndrome urémico hemolítico en pediatría. *Rev Med Sinerg*. 4(4):55-66.
- **CHEKABAB, S.; PAQUIN-VEILLETTE, J.; DOZOIS, C.; HAREL, J.** 2013. The ecological habitat and transmission of *Escherichia coli* O157:H7. *FEMS Microbiol Lett*. 341(1):1-12.
- **CHIONG, M.; LEISEWITZ, A.; MÁRQUEZ, F.; VIRONNEAU, L.; ÁLVAREZ, M.; TISCHLER, N.; PIÑONES, O.; MORDENO, R.** 2018. Manual de normas de bioseguridad y riesgos asociados. Fondecyt-CONICYT. Santiago, Chile. Pp 11-56.
- **CHO, S.; HIOTT, L.; BARRETT, J.; MCMILLAN, E.; HOUSE, S.; HUMAYOUN, S.; ADAMS, E.; JACKSON, C.** 2018. Prevalence and characterization of *Escherichia coli* isolated from the upper Oconee watershed in Northeast Georgia. *PLOS ONE*. 13(5):e0197005.
- **COOLEY, M.; QUIÑONES, B.; ORYANG, D.; MANDRELL, R.; GORSKI, L.** 2014. Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, and *Listeria monocytogenes* at public access watershed sited in a California Central Coast agricultural region. *Front Cell Infect Microbiol*. 4:30.
- **CRIVELLI, X.; RUMI, M.; CARFAGNINI, J.; DEGREGORIO, O.; BENTANCOR, A.** 2012. Synanthropic rodents as possible reservoirs of Shiga toxicogenic *Escherichia coli* strains. *Front Cell Infect Microbiol*. 2:134.
- **CROOK, B.; SENIOR, H.** 2017. Wildlife as source of human *Escherichia coli* O157 infection. *Emerg Infect Dis*. 23(12):2122.
- **CROXEN, M.; LAW, R.; SCHOLZ, R.; KEENEY, K.; WLODARSKA, M.; FINLAY, B.** 2013. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev*. 26(4):822-40.
- **CUBILLOS, M.; SALAS, P.; ZAMBRANO, P.** 2015. Microalbuminuria en pacientes pediátricos con diagnóstico de síndrome hemolítico urémico. *Rev Chil Pediatr*. 86(2):92-6.

- **DELBEKE, S.; CEUPPENS, S.; TITZE, C.; CASTRO, I.; JACZSENS, L.; DE ZUTTER, L.; UYTTENDAELE, M.** 2015. Microbial safety and sanitary quality of strawberry primary production in Belgium: Risk factors for Salmonella and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* contamination. *Appl Environ Microbiol.* 81(7):2562-70.
- **DEL COGLIANO, M.** 2019. Estudio del bacteriófago implicado en la expresión de la toxina Shiga. Tesis doctoral. Universidad Nacional de Quilmes, Argentina. 194 pp.
- **DELL'ORCO, M.; BERTAZOOLLO, W.; PAGLIARO, L.; ROCCABIANCA, P.; COMAZZI, S.** 2005. Haemolytic uremic syndrome in a dog. *Vet Clin Pathol.* 34:264-69.
- **DESMARCHELIER, P.; FEGAN, N.** 2003. Enteropathogenic *Escherichia coli*. **In:** Foodborne Microorganisms of Public Health Significance. AIFST. 9(6):267-310.
- **DONNENBERG, M.** 2013. Enterohemorrhagic and other Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. **In:** *Escherichia coli: Pathotypes and Principles of Pathogenesis.* 5:121-82.
- **EU-RL VTEC.** 2012. Laboratory procedure for the detection of Shiga toxin (Verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* (STEC/VTEC) belonging to O157, O111, O26, O103 and O145 serogroups in seed samples – Qualitative Method. [en línea] <http://old.iss.it/binary/vtec/cont/PT9_Report.pdf> [consulta: 22-05-2020].
- **FAKHOURI, F.; ZUBER, J.; FREMAUX-BACCI, V.; LOIRAT, C.** 2017. Haemolytic uraemic syndrome. *Lancet.* 390(10095):681-96.
- **FARFÁN, M.; TORRES, A.** 2012. Molecular mechanisms that mediate colonization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains. *Infect Immun.* 80(3):903-13.
- **FARFÁN, A.; ARIZA, S., VARGAS, F., VARGAS, L.** 2016. Mecanismos de virulencia de *Escherichia coli* enteropatógena. *Rev Chil Infectol.* 33(4):438-50.
- **FARROKH, C.; JORDAN, K.; AUVRAY, F.; GLASS, K.; OPPEGAARD, H.; RAYNAUD, S.; THEVENOT, D.; CONDRON, R.; DE REU, K.; GOVARIS, A.; HEGGUM, K.; HEYNDRICKX, M.; HUMMERJOHANN, J.; LINDSAY, D.; MISZCZYCH, S.; MOUSSIEGT, S.; VERSTRAETE, K.; CERF, O.** 2012. Review of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and their significance in dairy production. *Int J Food Microbiol.* 3-23.
- **FRANZ, E.; VAN HOEK, A.; WUITE, M.; VAN DER WAL, F.; DE BOER, A.; BOUW, E.; AARTS, H.** 2015. Molecular hazard identification of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC). *PLOS ONE.* 10(3):0120353.
- **FREMAUX, B.; COMBARET, C.; ROZAND, C.** 2008. Long-term survival of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in cattle effluents and environment. *Vet Microbiol.* 132:1-18.
- **GALARCE, N.; ESCOBAR, B.; SÁNCHEZ, F.; PAREDES-OSSES, E.; ALEGRÍA-MORÁN, R.; BORIE, C.** 2019. Virulence genes, Shiga toxin subtypes, serogroups, and clonal relationship of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from livestock and companion animals. *Animals.* 9(10):733.

- **GALLI, K.; TORRES, A.; RIVAS, M.** 2010. Identification of the long polar fimbriae gene variants in the locus of enterocyte effacement-negative Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from humans and cattle in Argentina. *FEMS Microbiol Lett.* 308:123-29.
- **GARVEY, P.; CARROLL, A.; MCNAMARA, E.; MCKEOWN, P.** 2016. Verotoxigenic *Escherichia coli* transmission in Ireland: A review of notified outbreaks, 2004 - 2012. *Epidemiol Infect.* 144:917-26.
- **GRIF, K.; ORTH, D.; LEDERER, I.; BERGHOLD, C.; ROEDL, S.; MACHE, C.; DIERICH, M.; WURZNER, R.** 2005. Importance of environmental transmission in cases of EHEC O157 causing hemolytic uremic syndrome. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 24:268-71.
- **GYLES, C.** 2007. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: An overview. *J Anim Sci.* 85(13):45-82.
- **HEIMAN, K.; MODY, R.; JOHNSON, S.; GRIFFIN, P.; GOULD, L.** 2015. *Escherichia coli* O157 outbreaks in the United States, 2003 - 2012. *Emerg Infect Dis.* 21(8):1293-1301.
- **HEROLD, S.; KARCH, H.; SCHMIDT, H.** 2004. Shiga toxin-encoding bacteriophages: Genome in motion. *Int J Med Microbiol.* 294(2-3):115-21.
- **HILL, V.; POLACZYK, A.; HAHN, D.; NARAYANAN, J.; CROMEANS, T.; ROBERTS, J.; AMBURGEY, J.** 2005. Development of a rapid method for simultaneous recovery of diverse microbes in drinking water by ultrafiltration with sodium polyphosphate and surfactants. *Appl Environ Microbiol.* 71:6878-84.
- **HOLVOET, K.; SAMPERS, I.; SEYNNAEVE, M.; JACXSEN, L.; UYTENDAELE, M.** 2015. Agricultural and management practices and bacterial contamination in greenhouse versus open field lettuce production. *Int J Environ Res Public Health.* 12(1):32-63.
- **HOWIE, H.; MUKERJEE, A.; COWDEN, J.; LEITH, J.; REID, T.** 2003. Investigation of an outbreak of *Escherichia coli* O157 infection caused by environmental exposure at a scout camp. *Epidemiol Infect.* 131:1063-69.
- **HUANG, W.; HSU, B.; KAO, P.; TAO, C.; HO, Y.; KUO, C.; HUANG, Y.** 2016. Seasonal distribution and prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in different aquatic environments in Taiwan. *Ecotoxicol Environ Saf.* 124:37-41.
- **IJZERMAN, M.; DAHLING, D.; FOUT, G.** 1997. A method to remove environmental inhibitors prior to the detection of waterborne enteric viruses by reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Virol Methods.* 63:145-53.
- **INSTITUTO DE SALUD PÚBLICA.** 2017. Vigilancia de laboratorio de *E. coli* productora de toxina Shiga. Chile, 2010-2016. Boletín Instituto de Salud Pública de Chile. [en línea] < <https://www.ispch.cl/sites/default/files/BoletinSTEC-14082017B.pdf>> [consulta: 28-01-2020].

- **JINCAI, M.; IBEKWE, M.; YI, X.; WANG, H.; YAMAZAKI, A.; CROWLEY, G.; YANG, C.** 2011. Persistence of *Escherichia coli* O157:H7 and its mutants in soils. PLOS ONE. 6(8):e23191.
- **JINCAI, M.; IBEKWE, M.; CROWLEY, D.; YANG, C.** 2014. Persistence of *Escherichia coli* O157 and non-O157 strains in agricultural soils. Sci Total Environ. 490: 822-29.
- **JOHANNESSEN, G.; ECKNER, K.; HEIBERG, N.; MONSHAUGEN, M.; BEGUM, M.; OKLAND, M.; HOGASEN, H.** 2015. Occurrence of *Escherichia coli*, *Campylobacter*, *Salmonella* and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Norwegian primary production of strawberries. Int J Environ Res Public Health. 17;12(6):6919-32.
- **KEENE, W.; MCANULTY, J.; HOESLY, F.; WILLIAMS, P.; HEDBERG, K.; OXMAN, G.; BARRETT, T.; PFALLER, M.; FLEMING, D.** 1994. A swimming associated outbreak of hemorrhagic colitis caused by *Escherichia coli* O157:H7 and *Shigella Sonnei*. New Eng J Med. 331:579-84.
- **KRAUSE, M.; BARTH, H.; SCHMIDT, H.** 2018. Toxins of locus of enterocyte effacement-negative Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. Toxins. 10(6):241.
- **LEE, M.; KOO, S.; JEONG, D.; TESH, V.** 2016. Shiga toxins as multi-functional proteins: Induction of host cellular stress responses, role in pathogenesis and therapeutic applications. Toxins. 17(3):77.
- **MACORI, G.; MCCARTHY, S.; BURGUESS, C.; FANNING, S.; DUFFY, G.** 2020. Investigation of the causes of Shigatoxigenic *Escherichia coli* PCR positive and culture negative samples. Microorganisms. 8(4):587.
- **MALYUKOVA, I.; MURRAY, K.; ZHU, C.; BOEDEKER, E.; KANE, A.; PATTERSON, K.; PETTERSON, J.; DONOWITZ, M.; KOVBASNJUK, O.** 2009. Macropinocytosis in Shiga toxin 1 uptake by human intestinal epithelial cells and transcellular transcytosis. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 296:G78-93.
- **MARTÍNEZ, F.; AVELAR, F., GARNEAU, P.; MÁRQUEZ, F.; GUERRERO, A.; HAREL, J.** 2013. Presence of multi-drug resistant pathogenic *Escherichia coli* in the San Pedro River located in the state of Aguascalientes, Mexico. Front Microbiol. 4:147.
- **MCGOWAN, K.; WICKERSHAM, E.; STROCKBINE, N.** 1989. *Escherichia coli* O157:H7 from water. Lancet. 967-68.
- **MCWILLIAMS, B.; TORRES, A.** 2014. EHEC adhesins. Microbiol Spectr. 2(2):3-20.
- **MELE, C.; REMUZZI, G.; NORIS, M.** 2014. Hemolytic uremic syndrome. Semin Immunopathol. 36:399-420.
- **MINISTERIO DE SALUD.** 2004. Reglamento sobre notificación de enfermedades transmisibles de declaración obligatoria. Ministerio de Salud, Chile. [en línea] <<https://www.bcn.cl/leychile/navegar?idNorma=1074206&idVersion=2015-01-24>> [consulta: 28-01-2020].

- **MINISTERIO DE SALUD.** 2020. Reglamento sobre notificación de enfermedades transmisibles de declaración obligatoria y su vigilancia. Ministerio de Salud, Chile. [en línea] <
<https://www.diariooficial.interior.gob.cl/publicaciones/2020/01/24/42561/01/1715587.pdf>> [consulta: 28-01-2020].
- **MORRIS, D.; KAVANAGH, S.; CARNEY, K.; MACDOMHNAILL, B.; CORMICAN, M.** 2016. CapE (capture, amplify, extract): A rapid method for detection of low-level contamination of water with Verocytotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC). *Sci Total Environ.* 563:267-72.
- **MUKHERJEE, A.; CHO, S.; SCHEFTEL, J.; JAWAHIR, S.; SMITH, K.; DIEZ-GONZÁLEZ, F.** 2006. Soil survival of *Escherichia coli* O157:H7 acquired by a child from garden soil recently fertilized with cattle manure. *J Appl Microbiol.* 101(2):429-36.
- **MUNIESA, M.** 1998. Bacteriófagos portadores del gen de la Stx2 en aguas. Tesis doctoral. Universidad de Barcelona, Facultad de Biología. 70 p.
- **MURAKAMI, K.; ETOH, Y.; ICHIHARA, S.; MAEDA, E.; TAKENAKA, S.; HORIKAWA, K.; NARIMATSU, H.; KAWANO, K.; KAWAMURA, Y.; ITO, K.** 2014. Isolation and characteristics of shiga toxin 2f-producing *Escherichia coli* among pigeons in Kyushu, Japan. *PLOS ONE.* 9(1):e86076.
- **NADYA, S.; DELAQUIS, P.; CHEN, K.; ALLEN, K.; JOGNSON, R.; ZIEBELL, K.** 2016. Phenotypic and genotypic characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from surface waters and sediments in a Canadian urban-agricultural landscape. *Front Cell Infect Microbiol.* 6(36).
- **OBRIG, T.** 2010. *Escherichia coli* shiga toxin mechanisms of action in renal disease. *Toxins.* 2:2769-94.
- **PARSHIONIKAR, S.; CASHDOLLAR, J.; FOUT, G.** 2004. Development of homologous viral internal controls for the use in RT-PCT assays of waterborne enteric viruses. *J Virol Methods.* 121:39-48.
- **PATON, J.; PATON, A.** 1998. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection. *Clin Microbiol Rev.* 11(3):450-79.
- **PATON, A.; SRIMANOTE, P.; WOODROW, M.; PATON, J.** 2001. Characterization of Saa, a novel autoagglutinating adhesin produced by Locus of Enterocyte Effacement-negative Shigatoxigenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans. *Infect Immun.* 69(11):6999-7009.
- **PATON, J., PATON A.** 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):271-74.
- **PERSAD, A.; LEJEUNE, J.** 2014. Animal reservoirs of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Microbiol Spect.* 2(4):EHEC-0027-2014.

- **PISTONE, V.; NUÑEZ, P.; BOCCOLI, J.; SILBERSTEIN, C.; ZOTTA, E.; GOLDSTEIN, J.; IBARRA, C.** 2006. Papel de la toxina Shiga en el síndrome hemolítico urémico. *Medicina*. 66(3):11-15.
- **PROBERT, W., MILLER, G., LEDIN, K.** 2017. Contaminated stream water as source of *Escherichia coli* O157 illness in children. *Emerg Infect Dis*. 23(7):1216-18.
- **RAMÍREZ, F.; AVELAR, F.; GARNEAU, P.; MÁRQUEZ, F.; GUERRERO, A.; HAREL, J.** 2013. Presence of multi-drug resistant pathogenic *Escherichia coli* in the San Pedro River located in the State of Aguascalientes, Mexico. *Front Microbiol*. 17(4):147.
- **REYNOLDS, C.; CHECKLEY, S.; CHUI, L.; OTTO, S.; NEUMANN, N.** 2020. Evaluating the risks associated with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in private well waters in Canada. *Can J Microbiol*. 66(5):337-50.
- **RIVAS, M., CHINEN, I.; GUTH, B.** 2016. Enterohemorrhagic (Shiga toxin-producing) *Escherichia coli*. In: *Escherichia coli* in the Americas. Springer. Texas, USA. Pp 97-123.
- **ROBERTS, T.; TOMPKIN, R.; BAIRD-PARKER, A.** 1996. Microorganisms in foods: Microbiological specifications of food pathogens. Springer. (5):514.
- **SAMAD, A.; ABBAS, F.; RIZWAN, M.; YOUSAF, M.; HASSAN, Y.; NAEEM, M.; ZAHID, M.; POKRYSHKO, O.; DIACONESCU, S.; SAIFULLAH, S.** 2018. Isolation and identification of *Shigella* species from food and water samples of Quetta, Pakistan. *Pure Appl Biol*. 7(1):227-35.
- **SAXENA, T.; KAUSHIK, P.; KRISHNA, M.** 2015. Prevalence of *E. coli* O157:H7 in water sources: An overview on associated diseases, outbreaks, and detection methods. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 82(3):249-64.
- **SCHRADER, C.; SCHIELKE, A.; ELLERBROEK, L.; JOHNE, R.** 2012. PCR inhibitors: Occurrence, properties, and removal. *J Appl Microbiol*. 113(5):1014-26.
- **SCIPIONI, A.; MAUROY, A.; ZIANT, D.; SAEGERMAN, C.; THIRY, E.** 2008. A SYBR Green RT-PCT assay in single tube to detect human and bovine noroviruses and control for inhibition. *Virology*. 5:94.
- **SHÜLLER, S.** 2011. Shiga-toxin interaction with human intestinal epithelium. *Toxins*. 11(3):626-39
- **SILVA, C.; BRANDON, D.; SKINNER, C.; HE, X.** 2017. Shiga toxins: A review of structure, mechanism, and detection. FMFS. Springer, Cham. [en línea] <https://doi-org.uchile.idm.oclc.org/10.1007/978-3-319-50580-0_1> [consulta: 04-02-2021].
- **SPARTÁ, G.; NEF, S.; NEUHAUS, T.; LATAL, B.; BUDER, K.; LAUBE, G.** 2015. Neurodevelopmental long-term outcome in children after hemolytic uremic syndrome. *Pediatr Nephrol*. 30(3):504-13.
- **TAMAGNINI, L.; PARAJE, M.** 2015. ¿Que son las bacterias viables pero no cultivables?: Revisión bibliográfica. *Rev Fac Cienc Exactas Fis Nat*. 2(2).

- **TRATCHMAN, H.; AUSTIN, C.; LEWINSKI, M.; STAHL, R.** 2012. Renal and neurological involvement in typical Shiga toxin-associated HUS. *Nat Rev Nephrol.* 8:658-69.
- **VENDRAMIN, T.; MARA, D.; DIAS, R.; VOLKEN, C.; UHRIG, R.; POZZOBON, A.; CUNHA, I.** 2014. Molecular screening of bovine raw milk for the presence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) on dairy farms. *Food Sci Technol.* 34(3):604-8.
- **VIDAL, R.; VIDAL, M.; LAGOS, R.; LEVINE, M.; PRADO, V.** 2004. Multiplex PCR for diagnosis of enteric infections associated with diarrheagenic *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol.* 42(4):1787-89.
- **VIDAL, M., ESCOBAR, P., PRADO, V., HORMAZÁBAL, J., VIDAL, R.** 2007. Distribution of putative adhesins in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from different sources in Chile. *Epidemiol Infect.* 135(4):688-94.
- **ZHANG, T.; WANG, H.; WU, L.; LOU, J.; WU, J.; BROOKES, P.; XU, J.** 2013. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in soils from Jiangsu province, China. *PLOS ONE.* 8(12):e81178.

ANEXOS

Anexo 1. Certificado de Bioseguridad otorgado por el Comité de Bioseguridad de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile



CERTIFICADO N° 103

Santiago, 07, noviembre, 2017

El Comité de Bioseguridad de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, ha revisado el proyecto titulado, "Revealing the role of animal-environment interface as a reservoir of Shiga toxin-producing Escherichia coli strains in Metropolitan Region; Animal and Environmental Health as promoter of National Public Health" que fue adjudicado en el Concurso FONDECYT de Iniciación en la Investigación 2017 con el N°11170363 y cuyo Investigador Responsable es el Dr. Nicolás Galarce., profesional de FAVET.

El proyecto cumple las normas de bioseguridad que se encuentran descritas en el mismo y en el formulario de solicitud de certificados de bioseguridad de FAVET, y que son las adecuadas según las especificaciones contenidas en el "Manual de Bioseguridad en el Laboratorio, de la Organización Mundial de la Salud (versión 2005)" y en el "Manual de Bioseguridad de Conicyt" (versión 2008), que previenen los riesgos para las personas, los animales y el medioambiente.


DRA. LISETTE LAPIERRE A.
Coordinadora
Comité de Bioseguridad
FAVET

