

## Detección y caracterización de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga a partir de casos clínicos y de alimentos en Uruguay

G. VARELA<sup>1\*</sup>, I. CHINEN<sup>2</sup>, P. GADEA<sup>1</sup>, E. MILIWEBSKY<sup>2</sup>, M.I. MOTA<sup>1</sup>, S. GONZÁLEZ<sup>1</sup>, G. GONZÁLEZ<sup>1</sup>, M.J. GUGLIADA<sup>2</sup>, C.C. CARBONARI<sup>2</sup>; G. ALGORTA<sup>1</sup>, M. BERNADÁ<sup>3</sup>, R. SABELLI<sup>3</sup>, L. PARDO<sup>1,3</sup>, M. RIVAS<sup>2</sup>, F. SCHELOTTO<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Bacteriología y Virología, Facultad de Medicina, Instituto de Higiene "Arnoldo Berta". Av. A. Navarro 3051 (11600) Montevideo, Uruguay; <sup>2</sup>Servicio Fisiopatogenia, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán". Av. Vélez Sarsfield 563 (1281) Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina;

<sup>3</sup>Instituto de Pediatría, Facultad de Medicina. Hospital "Pereira Rossell". Av. Blvr. Artigas 1550 (11600) Montevideo, Uruguay.

\*Correspondencia. E-mail: gvarela@higiene.edu.uy

### RESUMEN

Establecimos la frecuencia de aislamiento de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga (STEC) a partir de muestras clínicas y de alimentos, así como las características fenotípicas y genotípicas de las cepas recuperadas. Se analizaron 198 muestras fecales de niños con diarrea sanguinolenta (DS), 14 muestras fecales de niños con síndrome urémico hemolítico (SUH) y 220 muestras de carne picada. También se estudiaron 4 cepas STEC aisladas de alimentos embutidos. Se recuperó STEC de 3 (1,5%) de los niños con DS, de 1 (7%) niño con SUH y de 4 (1,8%) de las muestras de carne picada. Todas las cepas fueron *eae* y *ehxA* positivas. Los serotipos detectados fueron: O157:H7 (9 cepas), O26:H11 (2 cepas), O111:NM (1 cepa) y O145:HNT (1 cepa). Todas las cepas O157:H7 portaron el subtipo *eae*- $\gamma$ 1; las cepas O26:H11 y O145:HNT portaron el subtipo *eae*- $\beta$ 1 y la cepa O111:NM portó el subtipo *eae*- $\gamma$ 2/ $\theta$ . Las cepas STEC del mismo serogrupo mostraron alta diversidad genética. En Uruguay STEC no sería agente frecuente de diarrea con sangre en niños. Sin embargo, las cepas recuperadas presentaron los genes asociados con enfermedad severa y 2 de los 3 niños infectados con STEC evolucionaron a SUH. La carne picada y otros alimentos serían vehículos importantes de O157:H7.

**Palabras clave:** STEC, SUH, diarrea sanguinolenta, alimentos

### ABSTRACT

**Detection and characterization of Shiga toxin - producing *Escherichia coli* from clinical cases and food in Uruguay.** We have assessed the frequency of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in clinical and food samples as well as studied the genotypic and phenotypic characteristics of the recovered strains. One hundred ninety eight fecal samples from children with bloody diarrhea (BD), 14 from children with hemolytic uremic syndrome (HUS), 220 ground beef samples and 4 STEC isolates from other beef-derived products were analyzed. The STEC strains were isolated from 3 (1.5%) children with bloody diarrhea, 1 (7%) from a child with HUS and 4 (1.8%) from ground beef samples. All strains were *eae* and *ehxA* positive. The serotypes found were: O157:H7 (9 strains), O26:H11 (2), O111:NM (1) and O145:HNT (1). All O157:H7 STEC strains harbored the *eae* subtype  $\gamma$ 1, O26:H11 and O145:HNT strains, subtype  $\beta$ 1 and O111:NM strain, subtype  $\gamma$ 2/ $\theta$ . The STEC strains of the same serogroup showed high genetic diversity. In Uruguay, STEC is not frequently isolated from cases of bloody diarrhea in children. However, all the recovered STEC strains carried the genes associated with severe disease and 2 out of 3 children infected with STEC developed HUS. Ground beef and other food products might be important vehicles for O157:H7 strains.

**Key words:** STEC, HUS, bloody diarrhea, food

### INTRODUCCIÓN

Las cepas de *Escherichia coli* productoras de toxina Shiga (STEC) constituyen un grupo importante dentro del conjunto de patógenos emergentes transmitidos por alimentos. En los seres humanos estas bacterias se asocian con un amplio espectro de manifestaciones clínicas que varía desde diarrea leve y autolimitada hasta procesos más graves, muchas veces con secuelas importan-

tes, como colitis hemorrágica (CH) o síndrome urémico hemolítico (SUH) (27, 38).

El SUH está definido por la tríada clásica: anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia y falla renal aguda, precedidas habitualmente por diarrea con sangre. Es una enfermedad que afecta principalmente a los niños y que se presenta fundamentalmente como casos esporádicos en los países del Cono Sur, especialmente en Argentina (18, 19).

En Uruguay ocurren entre 10 y 15 casos nuevos por año, y la tasa de incidencia es de 4 a 5/100.000 niños menores de 5 años, aproximadamente. En Argentina la OPS considera que el SUH es endémico, con 400 casos nuevos por año y una incidencia estimada para el año 2005 de 13,9/100.000 niños menores de 5 años (42).

El ganado bovino y otros rumiantes domésticos constituyen el reservorio más importante para estos agentes. La infección se adquiere habitualmente por el consumo de carne mal cocida o de otros alimentos contaminados con heces de estos animales. La transmisión directa de persona a persona también ocurre y se observa, sobre todo, en jardines maternos e infantiles, hogares para ancianos e instituciones para enfermos mentales (21).

La producción de toxina Shiga (Stx) representa el atributo de virulencia más importante en STEC y es el factor que define este patotipo. Las cepas STEC productoras de Stx2 determinan enfermedades más severas que las causadas por las que producen Stx1 (16). Las cepas STEC asociadas con SUH también se conocen como *E. coli* enterohemorrágicas clásicas (EHEC) y presentan, además de la capacidad de producir toxina Shiga, otros atributos de virulencia.

La mayoría de las cepas EHEC poseen un plásmido de gran tamaño (60 MDa) que tiene el gen *ehxA* que codifica una hemolisina (EHEC-HlyA) y portan, además, una isla de patogenicidad denominada LEE (*locus of enterocyte effacement*) de 35 kb, ubicada en el cromosoma bacteriano que contiene, entre otros, el gen *eae* que codifica la intimina, los genes *esp* (*E. coli* secreted proteins), el gen *tir* que codifica para el receptor translocado de intimina y los genes para la síntesis del sistema de secreción tipo III (6, 25, 45).

En cepas STEC y de *E. coli* enteropatógeno clásico (EPEC) de diferentes serotipos se han descrito más de 20 variantes del gen *eae*. Las cepas que expresan intimina tipo  $\alpha$  se adhieren, sobre todo, a nivel del intestino delgado; las cepas con intimina tipo  $\gamma 1$  y  $\gamma 2$ , en cambio, se unen fundamentalmente en el colon (14).

En los últimos años se han descrito nuevos serotipos STEC asociados a casos de diarrea con sangre y SUH. También se ha comunicado el aislamiento de cepas STEC *eae*-negativas a partir de individuos con SUH (36, 37). Estos hallazgos sugieren que el conjunto de cepas STEC relacionadas con enfermedades humanas es variable y que se necesitan estudios microbiológicos detallados para caracterizar las cepas prevalentes en una zona determinada, con la finalidad de conocer su epidemiología y determinar sus factores de virulencia.

El objetivo de este trabajo fue establecer la frecuencia de detección de STEC en muestras de origen humano y de alimentos, y determinar las características fenotípicas y los atributos de virulencia presentes en las cepas recuperadas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Muestras clínicas

Entre enero de 2002 y abril de 2005 se estudiaron 198 niños menores de 5 años que presentaron diarrea con sangre y 14 niños con diagnóstico de SUH. La mayoría eran usuarios de los servicios de salud pública.

Para el estudio microbiológico se obtuvo una muestra de materia fecal por evacuación espontánea. La detección de los patógenos entéricos habituales se realizó como se describió previamente (49).

Para la búsqueda de STEC, las muestras de heces se sembraron directamente en placas de agar MacConkey sorbitol (SMAC) (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, UK) y en caldo digerido triptico de soja (TSB) (Becton Dickinson France S.A.S., Le Pont de Claix, France) suplementado con 50  $\mu$ g/l de cefixima y 2,5 mg/l de telurito de potasio (bioMérieux Marcy/Étoile, France) (CT-TSB), seguido del aislamiento en placas de SMAC luego de 6 horas de incubación a 37 °C. Para la extracción de ADN se resuspendió una ansada de la zona de crecimiento confluyente de cada una de las placas de SMAC en buffer TE 1X pH 7,4 (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM) con Tritón X-100 al 1%, se calentó a 100 °C durante 10 minutos y luego se centrifugó a 13.000 rpm durante 5 minutos. El mismo procedimiento de extracción se realizó a partir de mezclas de colonias sorbitol positivas y negativas. En total se analizaron 40 colonias sospechosas por niño.

Dos  $\mu$ l del sobrenadante se utilizaron como templado en las reacciones de amplificación. La detección de los genes *stx1* y *stx2* se realizó por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando los cebadores VT1a (5' GAA GAG TCC GTG GGA TTA CG 3'); VT1b (5' AGC GAT GCA GCT ATT AAT AA 3') y VT2a (5' TTA ACC ACA CCC CAC CGG GCA GT 3'), VT2b (5' GCT CTG GAT GCA TCT CTG GT 3') (39). La amplificación se realizó en un volumen final de 25  $\mu$ l de una mezcla de reacción con las siguientes concentraciones: 0,2 mM de cada dNTP, 10 mM de Tris-HCl, 2 mM de MgCl<sub>2</sub> y 1,5 U de Taq polimerasa (Invitrogen, USA). Los cebadores VT1a,b y VT2a,b se usaron a una concentración de 0,8  $\mu$ M y 0,2  $\mu$ M, respectivamente. Se utilizó el termociclador GeneAmp® 2700 (AB, Applied Biosystem, Singapore).

Los productos de amplificación se revelaron por electroforesis en geles de agarosa al 2% en TBE 0,5X (Tris-HCl 89 mM, ácido bórico 89 mM y EDTA 2,5 mM) y tinción posterior con bromuro de etidio.

### Muestras de alimentos

Entre los años 2002 y 2005 se analizaron 220 muestras de carne picada obtenidas al azar en carnicerías de Montevideo, Maldonado y Soriano. La carne picada estaba pronta para la venta al público y se obtuvo una muestra por establecimiento.

Para la detección de STEC O157, 25 gramos de carne se colocaron en 225 ml de caldo EC modificado (ECm) (Becton Dickinson France S.A.S., Le Pont de Claix, France) suplementado con 20  $\mu$ g/ml de novobiocina (Sigma Chemical Co. St. Louis, USA). Las muestras se homogeneizaron en un homogeneizador tipo *Stomacher* durante 1 minuto y luego la mezcla se incubó a 37 °C durante 6-8 horas con agitación a 140 rpm. A partir de una alícuota de 1 ml se realizó la separación inmunomagnética (SIM Dynabeads; Dynal, Oslo, Norway) con perlas recubiertas con anticuerpos para el serogrupo O157, siguiendo las indicaciones del fabricante. El volumen resultante de la SIM se sembró en placas de agar SMAC y CT-SMAC. Las colonias sospechosas (S-) se estudiaron por reacción de aglutinación rápida en lámina con suero anti-O157 (Denka Seiken Co., Tokyo, Japan).

Para la detección de STEC O157 y no-O157, otra alícuota del ECm se sembró directamente en placas de agar SMAC y en agar CT-SMAC, y se realizó el tamizaje por PCR con los

cebadores VT1a y b y VT2a y b, de forma idéntica a la descrita antes para las muestras de origen humano.

También se estudiaron 4 cepas sospechosas de STEC aisladas a partir de alimentos embutidos y enviadas a nuestro laboratorio para completar su análisis fenotípico y genotípico.

### Caracterización de las cepas STEC

La identificación bioquímica de las cepas STEC se realizó mediante pruebas convencionales (13). Las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos se realizaron por la técnica de difusión en agar, de acuerdo con las recomendaciones del CLSI (12). Los antibióticos probados fueron los siguientes: ácido nalidíxico, ampicilina, cefoxitina, ceftriaxona, ciprofloxacina, cloranfenicol, gentamicina, nitrofurantoína, tetraciclina y trimetoprima-sulfametoxazol (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, UK). Se utilizaron como cepas control *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. El serotipo de las cepas STEC se determinó por reacciones de aglutinación utilizando antiseros contra los antígenos "O" y "H" disponibles en el mercado (Denka Seiken Co., Tokyo, Japan) y también sueros policlonales preparados en el Departamento de Bacteriología y Virología (49). Para establecer el biotipo de las cepas STEC O157:H7 se realizaron las siguientes pruebas bioquímicas: producción de ácido a partir de dulcitol, rafinosa, sorbitol y ramnosa; y prueba de  $\beta$ -glucuronidasa y de lisina decarboxilasa siguiendo procedimientos estándares (13). La producción y el tipo de toxina Shiga se determinó por ensayos de citotoxicidad y neutralización en cultivos de células Vero. Para los ensayos de neutralización se utilizaron anticuerpos monoclonales anti-Stx1 y anti-Stx2 (28). La producción de EHEC-HlyA se determinó mediante hemólisis en placas de agar sangre de oveja desfibrinada al 5% suplementada con  $\text{CaCl}_2$  (10 mM), según la metodología descrita por Beutin *et al.* (2).

La presencia de secuencias relacionadas con los genes *eae* y *ehxA* se determinó por PCR (5, 45). Los cebadores utilizados, la temperatura de hibridación y el tamaño del producto de amplificación esperado se presentan en la Tabla 1.

### Subtipificación de las cepas STEC

**Genotipificación de las cepas STEC.** Los subtipos del gen *eae* se determinaron por PCR utilizando cebadores específicos para las variantes descritas hasta el momento (5). Para la diferenciación de las variantes genéticas de Stx, se analizó el polimorfismo del tamaño de los fragmentos de restricción (RFLP) de los productos de amplificación obtenidos por PCR de una región de la subunidad B de las toxinas Stx2 y Stx1, según los procedimientos descritos por Tyler *et al.* y Zhang *et al.* (50, 54).

**Fagotipificación de STEC O157.** Los fagotipos (PT) de las cepas STEC O157:H7 se establecieron mediante el método descrito por Ahmed *et al.* (1) y luego extendido por Khakhria *et al.* (29). Los 16 fagos tipificadores capaces de identificar 88 PT, fueron provistos por R. Ahmed (National Microbiology Laboratory, Canadian Centre for Human and Animal Health, Winnipeg, Manitoba, Canada). Los patrones de lisis atípicos que no co-

respondieron a ningún PT previamente descrito fueron señalados como patrones RDNC (del inglés, *reacts but does not conform*).

**Electroforesis de campo pulsado.** El ensayo de macro-restricción y la separación de los fragmentos por electroforesis de campo pulsado (PFGE - *pulsed-field gel electrophoresis*) se realizaron utilizando el protocolo estandarizado de 24 horas de PulseNet para *E. coli* O157:H7, con modificaciones menores (15). La restricción enzimática del ADN inmovilizado en los "plugs" se realizó con 25 U de *XbaI* (Promega Corporation, Madison, USA) a 37 °C durante 18 horas. *BlnI* (Amersham Biosciences Corp., Piscataway, USA) fue utilizada como segunda enzima, según lo requerido. La cepa *Salmonella* Braenderup H1298 (prevista por el CDC, USA) se incluyó como patrón de referencia para el análisis. La electroforesis se realizó en un gel de agarosa al 1% (Seakem Gold Agarose, Cambrex Bio Science Rockland Inc., USA) con el buffer TBE (Tris-HCl 45 mM; ácido bórico 45 mM; EDTA 1 mM). Para la corrida electroforética se utilizó el equipo CHEF DR-III System (Bio-Rad Laboratories, USA) con las siguientes condiciones de corrida: tiempo inicial del pulso de 2,2 seg; tiempo final del pulso de 54,2 seg; 18 horas de corrida a 200 V y 14 °C de temperatura. La adquisición de la imagen se realizó mediante un equipo digital Gel Doc 2000 (Bio Rad). El análisis de los patrones electroforéticos se efectuó mediante el programa BioNumerics Software Package Ver. 4.0 (Applied Maths, Belgium) utilizando el coeficiente de Dice y UPGMA para generar los dendrogramas con un 1,5% de tolerancia. Además, se realizó el análisis visual de los patrones obtenidos.

## RESULTADOS

### STEC en muestras de origen humano

De 3 de los 198 niños con diarrea sanguinolenta estudiados (1,5%) se recuperaron 4 cepas STEC: dos del serotipo O26:H11, una O111:NM y una O145:HNT. En un caso se aislaron 2 serotipos STEC diferentes (O26:H11 y O145:HNT). En los niños estudiados, las cepas STEC ocuparon el tercer lugar de frecuencia, luego de *Shigella* spp. (25%) y *Campylobacter* spp. (8%). No hubo ningún caso de diarrea sanguinolenta con resultado positivo por PCR para *stx1/2* y cultivo negativo para STEC.

Dos de los 3 niños con diarrea sanguinolenta infectados con STEC evolucionaron a SUH. Ninguno de los 195 niños en los que no se detectó STEC desarrolló SUH. En uno de los 14 casos de SUH estudiados (7,1%) se recuperó STEC O157:H7. No hubo relación epidemiológica clínicamente demostrable entre los casos de infección por STEC documentados en este trabajo y tampoco se pudo establecer el origen de las infecciones.

**Tabla 1.** Cebadores y condiciones para amplificar genes de virulencia en cepas STEC.

Gen	Cebador	Secuencia 5'----3'	Temperatura de hibridación (°C)	Tamaño del amplicón (pb)	Referencias
<i>eae</i>	EAE1	GAGAATGAAATA AAGTCGT	55	775	Blanco <i>et al.</i> (5)
	EAE2	GCGGTATCTTTTCGCGTAATCGCC			
<i>ehxA</i>	HlyA1	GGTGCAGCAGAAAAAGTTGTAG	60	1551	Schmidt <i>et al.</i> (46)
	HlyA4	TCTCGCCTGATAGTGTGGTA			

### STEC en muestras de alimentos

De 4 de las 220 muestras de carne picada analizadas (1,8%) se aisló STEC del serotipo O157:H7. En ninguna de las muestras se obtuvo resultado positivo por PCR para *stx1/2* y cultivo negativo para STEC.

Las 4 cepas que habían sido recuperadas de alimentos embutidos correspondieron a STEC O157:H7.

### Características de las cepas STEC

Las 13 cepas, 5 de origen humano y 8 de origen alimentario, se identificaron como *E. coli* a través del estudio de sus características metabólicas y dieron resultado positivo en el ensayo de citotoxicidad en células Vero. Las 8 cepas O157:H7 recuperadas a partir de muestras de alimentos y la cepa O157:H7 de origen humano fueron del biotipo C (rafinosa, dulcitol y ramnosa positivas); ninguna de ellas fermentó sorbitol ni presentó actividad de  $\beta$ -glucuronidasa. Todas las cepas STEC no-O157 fermentaron el sorbitol. Las 2 cepas del serotipo O26:H11 no fermentaron la ramnosa ni el dulcitol. La cepa STEC O111:NM fue incapaz de decarboxilar la lisina. El 92,9% de las cepas STEC estudiadas fue sensible a los antimicrobianos ensayados. Una cepa O157:H7 aislada a partir de carne picada mostró resistencia a ampicilina, estreptomycin, gentamicina, tetraciclina y trimetoprima-sulfametoxazol.

Además, todas las cepas STEC fueron hemolíticas por el ensayo en agar sangre, y mediante la caracterización genotípica resultaron ser portadoras de los genes *eae* y *ehxA*.

### Subtipificación de las cepas STEC

Las 9 cepas del serotipo O157:H7 presentaron la variante *eae*- $\gamma$ 1; las 2 cepas O26:H11 y la cepa O145:HNT presentaron la variante *eae*- $\beta$ 1, y la cepa O111:NM presentó la variante *eae*- $\gamma$ 2/ $\theta$ .

Los genotipos *stx* detectados entre las 8 cepas STEC O157:H7 aisladas de alimentos fueron: *stx1* y *stx2c*

(*stx2vh-a*) (4 cepas), *stx2c* (*stx2vh-a*) (2 cepas), y *stx1* (2 cepas). La cepa STEC O157:H7 recuperada a partir de la niña con SUH resultó positiva para *stx2* y *stx2c* (*stx2vh-a*). Entre las cepas STEC no-O157, las 2 cepas O26:H11 portaron el genotipo *stx1*; la cepa O111:NM el genotipo *stx1* y *stx2*, y la O145:HNT el *stx2*. Parte de los resultados obtenidos se muestran en la tabla 2.

Una cepa STEC O157:H7 (*stx1*, *eae*- $\gamma$ 1, EHEC-Hly positiva) aislada de una muestra de alimento en el año 2004 no pudo ser recuperada a partir de la conservación a -70 °C para completar el estudio de subtipificación.

Siete de 8 cepas O157:H7 pudieron ser agrupadas en 5 fagotipos, PT2 (1 cepa), PT14 (1 cepa), PT32 (2 cepas), PT39 (2 cepas) y PT45 (1 cepa), mientras que una fue considerada RDNC, de acuerdo con lo indicado en materiales y métodos.

Las 8 cepas correspondientes al serotipo O157:H7 fueron procesadas por *Xba*I-PFGE y presentaron 7 patrones diferentes (Figura 1). Los patrones *Xba*I-PFGE fueron designados de la siguiente manera: UYEXHX01.0001, UYEXHX01.0002, UYEXHX01.0003, UYEXHX01.0004, UYEXHX01.0005, UYEXHX01.0006 y UYEXHX01.0007. Al comparar los patrones se observó que entre ellos existió al menos un 85% de similitud.

Los resultados obtenidos se analizaron teniendo en cuenta las diferentes técnicas de subtipificación utilizadas.

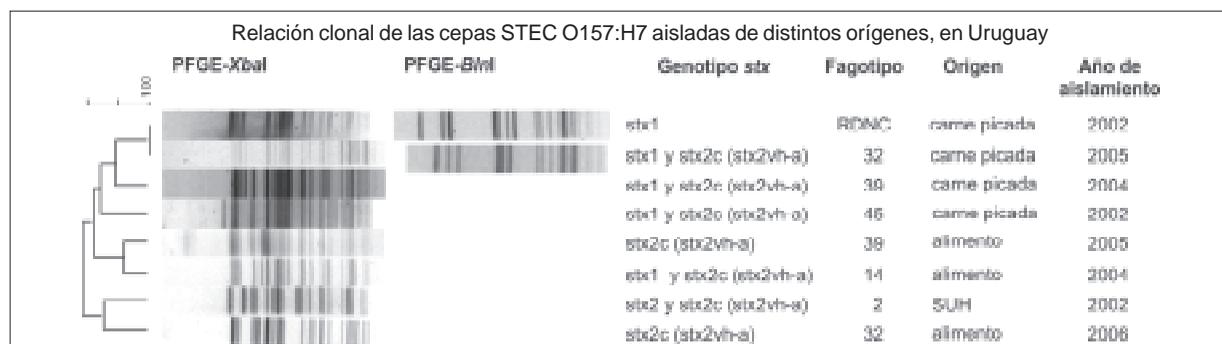
Dos cepas, aisladas en 2002 y 2005, presentaron un patrón idéntico por *Xba*I-PFGE (UYEXHX01.0002), pero pudieron ser diferenciadas mediante *Bln*I-PFGE, genotipificación de *stx* y fagotipificación, y resultaron ser UYEXHA26.0001/*stx1*/RDNC, y UYEXHA26.0002/*stx1* y *stx2c* (*stx2vh-a*)/PT32, respectivamente. Dicho patrón presentó un alto porcentaje de similitud (> 89%) con los patrones UYEXHX01.0003 [*stx1* y *stx2c* (*stx2vh-a*); PT45] y UYEXHX01.0004 [*stx1* y *stx2c* (*stx2vh-a*); PT39] (Figura 1).

Los patrones UYEXHX01.0005 [*stx2c* (*stx2vh-a*); PT39] y UYEXHX01.0007 [*stx1* y *stx2c* (*stx2vh-a*); PT14],

**Tabla 2.** Algunas características de las cepas STEC recuperadas.

Cepa	Origen	Serotipo	Tipo de <i>stx</i>	Subtipo de <i>eae</i>
DS 19	humano	O111:NM	<i>stx1-stx2</i>	$\gamma$ 2/ $\theta$
DS 49 <sup>(1)</sup>	humano	O26:H11	<i>stx1</i>	$\beta$ 1
DS 49 <sup>(1)</sup>	humano	O145:HNT	<i>stx2</i>	$\beta$ 1
DS 60 <sup>(1)</sup>	humano	O26:H11	<i>stx1</i>	$\beta$ 1
SUH 56	humano	O157:H7	<i>stx2-stx2c</i> ( <i>stx2vh-a</i> )	$\gamma$ 1
CP 195	alimento	O157:H7	<i>stx1</i>	$\gamma$ 1
CP 363	alimento	O157:H7	<i>stx1-stx2c</i> ( <i>stx2vh-a</i> )	$\gamma$ 1
CP M1	alimento	O157:H7	<i>stx1-stx2c</i> ( <i>stx2vh-a</i> )	$\gamma$ 1
CP Mal1	alimento	O157:H7	<i>stx1-stx2c</i> ( <i>stx2vh-a</i> )	$\gamma$ 1
IH7254	alimento	O157:H7	<i>stx2c</i> ( <i>stx2vh-a</i> )	$\gamma$ 1
IH7063	alimento	O157:H7	<i>stx2c</i> ( <i>stx2vh-a</i> )	$\gamma$ 1
IH5184	alimento	O157:H7	<i>stx1-stx2c</i> ( <i>stx2vh-a</i> )	$\gamma$ 1
IH9774	alimento	O157:H7	<i>stx1</i>	$\gamma$ 1

<sup>(1)</sup> Niños que evolucionaron a SUH.



**Figura 1.** Dendrograma que muestra la relación clonal entre las diferentes cepas STEC O157:H7. La macrorrestricción del ADN genómico se realizó con *XbaI* y para 2 cepas también con la enzima *BlnI* (15).

correspondientes a dos cepas de alimentos aisladas en 2005 y 2004, respectivamente, mostraron un 95% de similitud. El patrón UYEXHX01.0001 [*stx2* y *stx2c* (*stx2vh-a*); PT2], correspondiente a un caso de SUH ocurrido en 2002, presentó alto porcentaje de similitud (> 89%) con una cepa de alimento [UYEXHX01.0006; *stx2c* (*stx2vh-a*); PT32] aislada en 2006.

Las cepas STEC O26 (*stx1*) aisladas de dos casos de DS que evolucionaron a SUH presentaron los patrones UYEXSX01.0002 y UYEXSX01.0004 (datos no mostrados).

Las cepas STEC O111:NM (*stx1* y *stx2*) y O145:NM (*stx2*) aisladas de dos casos de DS en el año 2002 presentaron el patrón *XbaI*-PFGE UYEXSX01.0001 y UYEXSX01.0003 (datos no mostrados).

## DISCUSIÓN

Esta es la primera comunicación que describe la circulación de STEC no-O157 en Uruguay y establece su asociación con enfermedades graves en niños. Previamente se había informado la detección de STEC O157:H7 en un caso de SUH que ocurrió en una niña del interior del país (17).

En países de Europa continental las infecciones por cepas STEC no-O157 son más frecuentes que las producidas por cepas STEC O157:H7 (7, 40). Los serogrupos O26, O103 y O111 son responsables de la mayoría de las infecciones que ocurren en San Pablo, Brasil (51). En cambio, en EE.UU., Canadá, Inglaterra y Escocia el serotipo O157:H7 es el más frecuentemente asociado a infecciones en seres humanos (23, 47). El serotipo O157:H7 también se ubica en el primer lugar de frecuencia en los casos esporádicos de diarrea y SUH que ocurren en Argentina, seguido por los serogrupos O145 y O26 (43).

Los datos obtenidos en este trabajo sugieren que las cepas STEC no-O157 serían más frecuentemente detectadas que las correspondientes al serogrupo O157 en casos de diarrea sanguinolenta. Sin embargo, se requiere de otros estudios más completos y que incluyan en la metodología diagnóstica la utilización de procedimientos como la separación inmunomagnética (SIM) para O157, para poder confirmar o descartar esta tendencia.

En Uruguay, hasta el año 2002 no se había logrado recuperar cepas STEC a partir de niños con SUH o con diarrea sanguinolenta. En un estudio previo realizado entre 1994 y 1996, que incluyó 18 niños con diagnóstico de SUH internados en unidades de cuidados intensivos de Montevideo, el 47% mostró evidencia de infección por STEC. Sin embargo, en ninguno de los casos se pudo recuperar el agente responsable. La metodología diagnóstica utilizada en ese momento fue la búsqueda de citotoxinas libres en materia fecal por ensayos de citotoxicidad en células Vero, PCR para *stx* a partir de barridos de colonias y también la aglutinación en lámina para el antígeno O157 sobre colonias sospechosas tomadas de las placas de SMAC (44). Tampoco se logró detectar STEC O157 en otro estudio que incluyó 224 niños menores de 5 años con diarrea y en el que se utilizó únicamente el procedimiento de aglutinación en lámina para el antígeno O157 sobre colonias sospechosas (49).

En el año 2001 se incorporó a la metodología diagnóstica el uso de caldo CT-TSB, la utilización de placas de CT-SMAC y, como prueba de tamizaje, la PCR múltiple para los genes *stx1* y *stx2*. Como ocurrió en otros países, la inclusión de procedimientos más sensibles y avanzados permitió la recuperación y el estudio detallado de las cepas STEC (3). Todas las cepas STEC analizadas en este trabajo fueron recuperadas mediante esta metodología. Además, se procuró realizar la detección precoz de la infección por STEC en niños con diarrea sanguinolenta y antes de que recibieran tratamiento con antimicrobianos.

Sólo en uno de los 14 casos de SUH estudiados se pudo aislar STEC O157:H7. Esta baja tasa de recuperación puede deberse a distintos factores, como el uso de antibióticos, y también al tiempo transcurrido entre el inicio de la sintomatología y el procesamiento de las muestras de materia fecal de niños con SUH. Estos factores, solos o combinados, determinarían una disminución importante en la probabilidad de recuperar STEC (53). El 90% de los niños con SUH incluidos en este trabajo estaban recibiendo antibióticos en el momento de recoger las muestras de materia fecal, y en casi el 80% habían transcurrido más de 7 días entre el comienzo de la enfermedad y la recolección de los especímenes. No se reali-

zó la detección de citotoxinas libres en materia fecal, que seguramente hubiera aumentado el porcentaje de positividad. Tampoco se utilizó SIM, que mejora notablemente los porcentajes de recuperación de STEC O157 en los casos de SUH (26).

A diferencia de lo ocurrido en los casos de SUH aquí estudiados, la mayoría de los niños con diarrea sanguinolenta no habían recibido antibióticos en el momento de recoger las muestras de materia fecal y, además, fueron estudiados dentro de las 24-48 horas del comienzo de las manifestaciones clínicas. El porcentaje de recuperación de STEC fue del 1,5%. *Shigella* spp. y *Campylobacter* spp. fueron los agentes más frecuentemente recuperados en estos niños. Este resultado concuerda con los datos obtenidos en estudios realizados en regiones menos desarrolladas, que indican que STEC no sería un agente frecuente de gastroenteritis en niños pequeños que habitan en esas zonas (10, 30, 33). Se ha sugerido que la circulación frecuente de cepas del patotipo EPEC con los mismos antígenos de superficie "O" que STEC generaría en los niños de regiones más pobres cierto grado de protección cruzada frente a cepas de este último patotipo. Sin embargo, a pesar de la circulación documentada de EPEC de los serogrupos O26 y O111 a lo largo del tiempo en nuestro medio, se han recuperado cepas STEC de esos serogrupos en niños con diarrea sanguinolenta o SUH (5, 49).

Dos de los 3 niños infectados con STEC evolucionaron a SUH. Estos niños habían sido tratados con antibióticos. Este hecho muestra la importancia que estos agentes tienen para la salud de los niños pequeños y destaca la necesidad de disponer de laboratorios con metodología adecuada y recursos humanos entrenados para su correcta identificación. La detección precoz de los niños infectados con STEC evitaría tratamientos innecesarios, fundamentalmente con antibióticos, algunos de los cuales estarían asociados a una mayor probabilidad de desarrollar SUH con evolución desfavorable (47).

El consumo de alimentos contaminados con STEC constituye una vía importante para la transmisión de estos agentes a los seres humanos. Carne picada poco cocida, embutidos y otros alimentos como verduras, frutas y jugos se han asociado con brotes de SUH. El porcentaje de aislamiento en alimentos y la distribución de los serogrupos es variable entre las diferentes zonas. En EE.UU. la tasa de recuperación de STEC O157:H7 a partir de carne picada se ubica entre 0 y 3%; en Malasia, en cambio, se ha informado una tasa superior al 30% (20, 41, 48). En este trabajo se recuperó STEC en el 1,8% de las muestras de carne picada analizadas. Los 4 aislamientos correspondieron al serotipo O157:H7.

Esta es la primera comunicación que establece el papel en Uruguay de este alimento como vehículo potencial para la transmisión de STEC O157:H7. Los resultados obtenidos son similares a los datos comunicados por otros autores en regiones de Europa, en donde el porcentaje fue del 1-2% (4, 9, 22).

A pesar de haber utilizado una metodología similar, el porcentaje de recuperación de STEC O157:H7 fue menor (1,8% vs. 3,8%) que el encontrado en un estudio realizado en la ciudad argentina de Gualeguaychú, Entre Ríos (11).

A diferencia de lo que ocurrió en otras zonas, en este trabajo no se pudo recuperar STEC no-O157 a partir de las muestras de carne picada (4, 9, 22). Este resultado puede deberse al hecho de no haber utilizado la metodología recomendada para la detección de STEC no-O157, fundamentalmente en lo referido a las etapas de enriquecimiento y tamizaje por PCR (31, 35).

La capacidad de STEC para producir daño en los seres humanos se relaciona con el tipo de toxina Shiga que producen y con la presencia de otros factores de virulencia adicionales. Las 13 cepas STEC estudiadas correspondieron a serotipos EHEC clásicos y todas dieron resultado positivo por PCR para secuencias relacionadas con los genes *eae* y *ehxA*. El gen *eae* es un marcador estable de la presencia de la isla de patogenicidad LEE y numerosos estudios han demostrado la asociación entre LEE y la capacidad de las cepas STEC para causar procesos graves. La variabilidad en la secuencia nucleotídica de este gen ocurre fundamentalmente en el extremo 3' y determina cambios antigénicos importantes en la región carboxilo terminal de intimina responsable de la unión a Tir, conocida como int 280. Esta variabilidad se ha destacado como mecanismo evasor del sistema inmune tanto en EPEC como en STEC, ya que no habría protección cruzada contra la infección por cepas con tipos de intimina diferentes (8, 24). Por lo tanto, la identificación de los diferentes tipos de intimina tendría valor para estudios antigénicos, epidemiológicos y de relación clonal entre diferentes aislamientos de STEC.

Las variantes encontradas en este estudio fueron  $\gamma$ 1,  $\beta$ 1 y  $\gamma$ 2/0. Todas las cepas O157:H7 analizadas mostraron la variante  $\gamma$ 1, mientras que las 2 cepas O26 presentaron el tipo  $\beta$ 1. Estos hallazgos concuerdan con los resultados obtenidos en otras regiones, que muestran la asociación de estas variantes con los serogrupos mencionados (3, 4).

La presencia del gen *ehxA* también se asocia fuertemente con la capacidad de STEC para producir enfermedades más graves.

Una de las cepas O157:H7 recuperada a partir de carne picada fue resistente para ampicilina, trimetoprima-sulfametoxazol, gentamicina, estreptomina y tetraciclina. Un fenotipo multirresistente similar se encontró en cepas STEC del serogrupo O118 asociadas a infecciones en seres humanos y animales en varios países europeos (32). Estos resultados sugieren la importancia de las bacterias enteropatógenas como reservorio para genes de resistencia a los antibióticos. En el ámbito local, las cepas STEC no se detectan habitualmente en los laboratorios de microbiología clínica, por lo tanto sus patrones de resistencia son poco conocidos, así como los mecanis-

mos moleculares responsables (52). El tratamiento con antibióticos no está indicado en las infecciones por STEC que ocurren en seres humanos. Sin embargo, la utilización de estas sustancias en animales de producción como suplemento alimenticio o para evitar infecciones puede actuar como factor de selección de los cultivos STEC resistentes, que luego se transmiten a los seres humanos. Por estas razones y de acuerdo con los programas de vigilancia sugeridos por OPS y OMS resulta de importancia el monitoreo local de los mecanismos de resistencia en las bacterias entéricas, incluidas las STEC (34).

Las 8 cepas O157:H7 estudiadas por fagotipificación y PFGE mostraron fagotipos distintos y patrones de bandas diferentes, lo que determina su alta diversidad genética. Lo mismo ocurrió con las cepas O26 (datos no mostrados). Estos resultados concuerdan con el hecho de que en Uruguay no se han registrado aún brotes de infección por STEC.

En conclusión, STEC representa el tercer patógeno en orden de frecuencia después de *Shigella* y *Campylobacter* en las diarreas sanguinolentas en niños menores de 5 años, y se relaciona con casos esporádicos de SUH. Todas las cepas STEC que se lograron recuperar presentaron los genes de virulencia *eae* y *ehxA*, asociados con enfermedades graves en seres humanos, y la mayoría presentó el gen *stx2*. La carne picada y otros alimentos aparecen como vehículos de transmisión importantes para el serotipo O157:H7. En general, las cepas mostraron una alta sensibilidad a los antimicrobianos y entre las cepas circulantes del mismo serogrupo se observó alta diversidad genética. Estudios adicionales son necesarios para establecer la real prevalencia en niños con DS o SUH, en los diferentes vehículos de transmisión y en el reservorio animal, a fin de determinar la epidemiología de STEC en Uruguay y contribuir a delinear las estrategias de prevención y control necesarias a nivel nacional y regional.

## BIBLIOGRAFÍA

- Ahmed R, Bopp C, Borczyk A, Kasatiya S. Phage-typing scheme for *Escherichia coli* O157:H7. *J Infect Dis* 1987; 155: 806-9.
- Beutin L, Zimmermann S, Gleier K. Rapid detection and isolation of Shiga-like toxin (verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* by direct testing of individual enterohemolytic colonies from washed sheep blood agar plates in the VTEC-RPLA assay. *J Clin Microbiol* 2004; 34: 2812-4.
- Blanco JE, Blanco M, Alonso M, Mora A, Dahbi G, Coira MA, et al. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (Verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from human patients: Prevalence in Lugo, Spain, from 1992 through 1999. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 311-9.
- Blanco J, Blanco M, Blanco JE, Mora A, González E, Bernárdez MI, et al. Verotoxin-producing *Escherichia coli* in Spain: prevalence, serotypes, and virulence genes of O157:H7 and non-O157 VTEC in ruminants, raw beef products, and humans. *Exp Biol Med* 2003; 228: 345-51.
- Blanco M, Blanco JE, Dahbi G, Mora A, Alonso MP, Varela G, et al. Typing of intimin (*eae*) genes from enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) isolated from children with diarrhoea in Montevideo, Uruguay: identification of two novel intimin variants (*muB* and *zetaR/beta2B*). *J Med Microbiol* 2006; 55: 1165-74.
- Brunder W, Schmidt H, Frosch M, Karch H. The large plasmids of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) are highly variable genetic elements. *Microbiology* 1999; 145: 1005-14.
- Caprioli A, Tozzi AE. Epidemiology of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in continental Europe. En: Kaper JB, O'Brien AD, editors. *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* strains. Washington, D.C. ASM Press, 1998; p. 38-48.
- Carvalho H, Teel LD, Kokai-Kun JF, O'Brien AD. Antibody against the carboxyl terminus of intimin reduces enteropathogenic *Escherichia coli* adherence to tissue culture cells and subsequent induction of actin polymerization. *Infect Immun* 2005; 73: 2541-6.
- Chapman PA, Siddons CA, Cerdan Malo AT, Harkin MA. A one year study of *Escherichia coli* O157 in raw beef and lamb products. *Epidemiol Infect* 2000; 124: 207-13.
- Cheng A, Mac Donald JR, Thielman NM. Infectious diarrhea in developed and developing countries. *J Clin Gastroenterol* 2005; 39: 757-72.
- Chinen I, Tanaro JD, Miliwebsky E, Lound LH, Chillemi G, Ledri S, et al. Isolation and characterization of *Escherichia coli* O157:H7 from retail meats in Argentina. *J Food Protect* 2001; 64: 1346-51.
- Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS document M100-S15 (ISBN 1-56238-556-9). Clinical and Laboratory Institute, 940 West Valley Road. Suite 1400, Wayne, Pennsylvania, USA. 2005.
- Ewing WH. The genus *Escherichia coli*. En: Edwards and Ewing's identification of *Enterobacteriaceae*, 4th. ed. New York, Elsevier, 1985, p. 93-134.
- Fitzhenry RJ, Reece S, Trabulsi LR, Heuschkel R, Murch S, Thomson M, et al. Tissue tropism of enteropathogenic *Escherichia coli* strains belonging to the O55 serogroup. *Infect Immun* 2002; 70: 4362-8.
- Foodborne and Diarrheal Diseases Branch, Division of Bacterial and Mycotic Diseases, National Center for Infectious Diseases, Centers for Disease Control and Prevention. Standardized molecular subtyping of foodborne bacterial pathogens by Pulsed-Field Gel Electrophoresis. A Training Manual, 1998; Atlanta, GA, USA.
- Friederich A W, Bielaszewska M, Zhang WL, Pulz M, Kuczus T, Ammon A, et al. *Escherichia coli* harboring Shiga toxin 2 gene variants: frequency and association with clinical symptoms. *J Infect Dis* 2002; 185: 74-84.
- Gadea P, Varela G, Bernadá M, Sirok A, Mota MI, Sabelli R, et al. Primer aislamiento en Uruguay de *Escherichia coli* productora de toxina Shiga del serotipo O157:H7 en una niña con síndrome urémico hemolítico. *Rev Med Uruguay*. 2004; 20: 79-81.
- Gianantonio C, Vitacco M, Mendilaharsu F, Ruty A, Mendilaharsu J. The hemolytic uremic syndrome. *J Pediatr* 1964 64: 478-91.
- Gómez D, Miliwebsky E, Silva A, Deza N, Zotta C, Cotella O, et al. Aislamiento de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga durante un brote de gastroenteritis en un jardín maternal de la ciudad de Mar del Plata. *Rev Argent Microbiol* 2005, 37:176-81.
- Griffin PM. *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohemorrhagic *Escherichia coli*. En: Blaser MJ, Smith PD, Ravdin JI, Greenberg HB, Guerrant RL, editors. *Infections of the gastrointestinal tract*. New York, Raven Press, Ltd., 1995, p. 739-61.
- Griffin PM, Tauxe RV. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiol Rev* 1991; 13: 60-98.

22. Heuvelink AE, Zwartkruis-Nahuis JTM, Beumer RR, De Boer E. Occurrence and survival of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in meats obtained from retail outlets in The Netherlands. *J Food Prot* 1999; 62: 1115-22.
23. Jelacic JK, Damrow T, Chen GS, Jelacic S, Bielaszewska M, Ciol M, *et al.* Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Montana: bacterial genotypes and clinical profiles. *J Infect Dis* 2003; 188: 719-27.
24. Judge N, Mason HS, O'Brien AD. Plant cell-based intimin vaccine given orally to mice primed with intimin reduces time of *Escherichia coli* O157:H7 shedding in feces. *Infect Immun* 2004; 72: 168-75.
25. Kaper JB, Elliott S, Sperandino V, Perna NT, Mayhew GF, Blattner FR. Attaching-and-effacing intestinal histopathology and the locus of enterocyte effacement. En: Kaper JB and O'Brien AD editors. *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* strains. ASM Press, Washington D.C., 1998, p. 163-82.
26. Karch H, Janetzki-Mittman C, Aleksic S, Datz M. Isolation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains from patients with hemolytic-uremic syndrome by using immunomagnetic separation, DNA-based methods, and direct culture. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 516-9.
27. Karmali MA. Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 1989; 2: 5-38.
28. Karmali MA, Petric M, Lim C, Fleming PC, Arbus GS, Lior H. The association between idiopathic hemolytic uremic syndrome and infection by verotoxin-producing *E. coli*. *J Infect Dis* 1985; 151: 775-82.
29. Khakhria R, Duck D, Lior H. Extended phage-typing scheme for *Escherichia coli* O157:H7. *Epidemiol Infect* 1990; 105: 511-20.
30. Leelaporn A, Phengmak M, Eampoklap B, Manatsathit S, Tritilanunt S, Siritantikorn S, *et al.* Shiga toxin- and enterotoxin-producing *Escherichia coli* isolated from subjects with bloody and nonbloody diarrhea in Bangkok, Thailand. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003; 46: 173-80.
31. Leotta GA, Chinen I, Epszteyn S, Miliwebsky E, Melamed IC, Motter M, *et al.* Validación de una técnica de PCR múltiple para la detección de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga. *Rev Argent Microbiol* 2005; 37: 1-10.
32. Maidhof H, Guerra B, Abbas S, Elsheikha HM, Whittam TS, Beutin L. A multiresistant clone of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O118:[H16] is spread in cattle and humans over different European countries. *Appl Environ Microbiol* 2002; 68: 5834-42.
33. Okekel N, Lamikanra A, Steinruck H, Kaper JB. Characterization of *Escherichia coli* strains from cases of childhood diarrhea in provincial southwestern Nigeria. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 7-12.
34. Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud. Prevention and control of resistance to antimicrobials in America. 1999; Report OPS/HCP/HCT/139/99. Buenos Aires, Argentina.
35. Parma AE, Sanz ME, Blanco JE, Blanco J, Vinas MR, Blanco M, *et al.* Virulence genotypes and serotypes of verotoxigenic *Escherichia coli* isolated from cattle and foods in Argentina. Importance in public health. *Eur J Epidemiol* 2000; 16: 757-62.
36. Paton AW, Srimanote P, Woodrow MC, Paton JC. Characterization of Saa, a novel autoagglutinating adhesin produced by locus of enterocyte effacement-negative Shiga-toxigenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans. *Infect Immun* 2001; 69: 6999-7009.
37. Paton AW, Woodrow MC, Doyle RM, Lanser JA, Paton JC. Molecular characterization of a Shiga toxigenic *Escherichia coli* O113:H21 strain lacking *eae* responsible for a cluster of cases of hemolytic-uremic syndrome. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3357-61.
38. Paton JC, Paton AW. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11: 450-79.
39. Pollard DR, Johnson WM, Lior H, Tyler SD, Rozee KR. Rapid and specific detection of verotoxin genes in *Escherichia coli* by the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 540-5.
40. Pradel N, Livrelli V, De Champs C, Palcox JB, Reynaud A, Scheutz F, *et al.* Prevalence and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle, food, and children during a one-year prospective study in France. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 1023-31.
41. Radu S, Mutalib SA, Rusul G, Ahmad Z, Morigaki T, Asai N, *et al.* Detection of *Escherichia coli* O157:H7 in the beef marketed in Malaysia. *Appl Environ Microbiol* 1998; 64: 1153-6.
42. Rivas M, Miliwebsky E, Chinen I, Deza N, Leotta GA. Epidemiología del síndrome urémico hemolítico en Argentina. Diagnóstico del agente etiológico, reservorios y vías de transmisión. *Medicina (Buenos Aires)* 2006; 66 (Supl.III): 27-32.
43. Rivas M, Miliwebsky E, Chinen I, Roldan CD, Balbi L, García B, *et al.* Characterization and epidemiologic subtyping of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from hemolytic uremic syndrome and diarrhea cases in Argentina. *Foodborne Pathog Dis* 2006; 3: 88-96.
44. Schelotto F, Amorin B, Varela G, Pérez C, Betancor L. Síndrome urémico hemolítico en Uruguay y su relación con *E. coli* VTEC. 1er. Simposio de Infectología Pediátrica. SLIPE. 1996, p. 123 Montevideo, Uruguay.
45. Schmidt H, Beutin L, Karch H. Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933. *Infect Immun* 1995; 63: 1055-61.
46. Tarr PI, Besser TE, Hancock DD, Keene WE, Goldoft M. Verotoxigenic *Escherichia coli* infection: United States overview. *J Food Prot* 1997; 60: 1466-71.
47. Tarr PI, Gordon CA, Chandler WL. Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome. *Lancet*, 2005; 365:1073-86.
48. Tarr PI, Tran TN, Wilson RA. *Escherichia coli* O157:H7 in retail ground beef in Seattle: results of a one-year prospective study. *J Food Prot* 1999; 62: 133-9.
49. Torres ME, Pérez MC, Schelotto F, Varela G, Parodi V, Allende F, *et al.* Etiology of children's diarrhea in Montevideo, Uruguay: associated pathogens and unusual isolates. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 2134-9.
50. Tyler SD, Johnson WM, Lior H, Wang G, Rozee KR. Identification of verotoxin type 2 variant B subunit genes in *Escherichia coli* by the polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 1339-43.
51. Vaz TMI, Irino K, Kato MA, Dias AMG, Gomes TAT, Medeiros MC, *et al.* Virulence properties and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in São Paulo, Brazil, from 1976 through 1999. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 903-5.
52. Vignoli R, Varela G, Mota MI, Cordeiro NF, Power P, Ingold E, *et al.* Enteropathogenic *Escherichia coli* strains carrying genes encoding the PER-2 and TEM-116 extended-spectrum  $\beta$ -lactamases isolated from children with diarrhea in Uruguay. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 2940-3.
53. Wells JG, Davis BR, Wachsmuth IK, Riley LW, Remis RS, Sokolow R, *et al.* Laboratory investigation of hemorrhagic colitis outbreaks associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *J Clin Microbiol* 1983; 18: 512-20.
54. Zhang W, Bielaszewska M, Thorsten K, Karch H. Identification, characterization and distribution of a Shiga 1 gene variant (*stx<sub>1c</sub>*) in *Escherichia coli* strains isolated from humans. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 1441-6.