

69

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO



FACULTAD DE QUIMICA

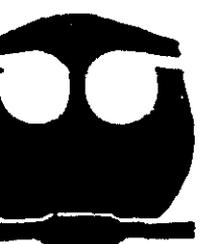


EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA

IMPORTANCIA CLINICA DE *Escherichia coli*

0157

**TRABAJO MONOGRAFICO DE
ACTUALIZACION
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
PRESENTA:
LETICIA ANGELICA LAGOS ESCAMILLA**



MEXICO, D.F.

2001

290 828



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

Presidente	Prof. Raúl Garza Velasco
Vocal	Prof. Maite Astigarraga Zavaleta
Secretario	Prof. Eduardo Bonilla Espinosa
1er. Suplente	Prof. Norma Angélica Castellanos Chávez
2º. Suplente	Prof. Rolando Salvador García Gómez

Sitio donde se desarrolló el tema :

Bibliotecas de la Facultad de Química, Medicina y del Sector Salud.

Asesor


Q.F.B. Raúl Garza Velasco

Sustentante


Leticia Angélica Lagos Escamilla

AGRADECIMIENTOS

A la UNAM y en especial a la Facultad de Química por todos estos años de estancia.

A mi asesor Raúl Garza Velasco por su dedicación y apoyo para la realización de este trabajo.

A Dios por darme la oportunidad de vivir.

A mi mamá Pily por todo su cariño, apoyo y confianza para la realización de esta meta.

A mi papá Angel por los regaños, cariño y comprensión.

A mis hermanos Mario y Miguel por aceptarme como soy y por su amor.

A mi esposo Fernando por todos estos años de amor, apoyo, motivación y ayuda para lograr esta meta.

A mi hijo Fer por la alegría que le ha dado a mi vida.

Al bebé que está por nacer lo espero con cariño.

A todos mis tíos, tías y primos por su cariño y apoyo durante toda mi vida.

A mis amigas Liliana, Yesica, Nohemí, Florencia, Dulce Ma., por toda su amistad y apoyo.

A mi amiga y compañera Marisela por todo el apoyo incondicional en mi carrera universitaria.

A mis amigas Angélica, Cecy, Mónica, Paty por las experiencias vividas en la Facultad.

ÍNDICE

	Página
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	5
I. ANTECEDENTES GENERALES	
i. Actual clasificación de las cepas de <i>E. coli</i> que causan diarrea al humano	6
ii. Definición de ECEH	8
II. PATOLOGIA	
i. Signos y síntomas generales	17
ii. El modelo "adherencia -efusión "	21
iii. Entidades clínicas	
*Infección asintomática y diarrea sin sangre	25
*Colitis hemorrágica	27
*Síndrome Urémico Hemolítico (HUS)	30
*Púrpura Trombocitopénica Trombótica (PTT)	36

iv.	Epidemiología	39
v.	Serotipos no - O157:H7	46

III. FACTORES DE VIRULENCIA

i.	Toxinas de Shiga	52
ii.	El papel de la Stx en la enfermedad intestinal	56
iii.	La Stx y el HUS	60
iv.	Enterotoxina EAST1	64
v.	Enterohemolisina	65
vi.	Factores de adherencia intestinal	64
	* Gen <i>eae</i>	67
	* Plásmido pO157	71
	* LPS	73
	* Procuración de hierro	74

III.	PREVENCIÓN Y TRATAMIENTO	
i.	Medidas higiénicas de prevención	75
ii.	Prevención relacionada con la elaboración y aplicación de vacunas	75
ii.	Tratamiento	78
IV.	DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO	83
	CONCLUSIONES	92
	BIBLIOGRAFIA	101

INTRODUCCIÓN

El género *Escherichia* agrupa a cinco especies: *E. blattae*, *E. fergusonii*, *E. hermannii*, *E. vulneris* y *E. coli*, entre las cuales esta última es la de mayor importancia para el humano, debido no sólo a que forma parte de la flora habitual del intestino sino porque, fundamentalmente, agrupa a diversas cepas que causan padecimientos extraintestinales, o bien, destacan entre los principales agentes etiológicos del síndrome diarreico.

Sin embargo, no puede soslayarse el hecho de que *E. hermannii* y *E. vulneris* ocasionan predominantemente infecciones de heridas y de que *E. fergusonii* ha empezado a relacionarse con ciertas patologías entéricas, por lo que sólo *E. blattae* continúa considerándose como ajena al hombre.

Por lo que se refiere a las cepas diarreagénicas, la lista de las categorías reconocidas sigue incrementándose y, a las de mayor familiaridad en nuestro medio (ECET, ECEP y ECEI), se han venido sumando las de ECEH, ECEA, ECAD y algunas otras cuya trascendencia aún no se ha logrado determinar con claridad. (59)

El presente trabajo se concentra en ECEH, a la cual es muy probable que, finalmente, se le cambie su denominación por la de STEC (por *Shiga toxin-producing E. coli*), en virtud de así lo sugieren sus características genéticas implicadas en el tipo de enfermedades que provoca al humano.

ECEH es el agente causal de numerosos brotes epidémicos asociados a la ingesta de agua y alimentos contaminados, a partir de la cual los individuos implicados adquieren diarreas comunes o sanguinolentas, e inclusive, el síndrome urémico hemolítico (HUS) o púrpura trombocitopénica trombótica (PTT). En este aspecto, el serotipo más

frecuente es el O157:H7, responsable de grandes epidemias en países desarrollados tales como E.U.A., Japón y el Reino Unido. Dicho serotipo sintetiza una gran cantidad de factores de virulencia, codificados por plásmidos, bacteriófagos e islas de patogenicidad, detectados también en algunas otras cepas de menor incidencia, entre las que figuran una variedad inmóvil O157:NM (NM = *nonmotile*), la O111:NM y la O26:H11. (2, 5, 6, 7, 17, 35, 36, 42, 46,56, 59,62, 66, 79,84)

Cabe subrayar que, en México y otros países en vías de desarrollo, la importancia de ECEH es difícil de ser estimada, habida cuenta de que la atención de los equipos de salud en los múltiples cuadros entéricos es justificadamente atraída por los *Rotavirus*, ECET, ECEP, *Shigella*, *Salmonella*, *Giardia lamblia* y *Entamoeba histolytica* y de que, adicionalmente, casi la totalidad de los laboratorios carece de la tecnología asociada a la detección de este microorganismo en las muestras clínicas; no obstante, resulta obvio que los médicos y

químicos deberán encontrarse expectantes, ya que es muy probable que los continuos brotes padecidos en otros países también lleguen a extenderse hasta nuestras regiones geográficas.

OBJETIVOS

- Describir los aspectos más relevantes de los cuadros patológicos asociados a ECEH y de los diversos factores de virulencia producidos por este microorganismo.
- Señalar las medidas preventivas y terapéuticas más eficaces para combatir las enfermedades ocasionadas por este importante agente etiológico.
- Describir los fundamentos de las principales metodologías relacionadas con el diagnóstico de laboratorio de las patologías debidas a ECEH.

I. ANTECEDENTES GENERALES

i. Actual clasificación de las cepas de *E. coli* que causan diarrea al humano

Hasta el momento se han reconocido por lo menos 6 categorías de cepas de *Escherichia coli* causantes del síndrome diarreico en humanos, a las cuales, considerando sus respectivos mecanismos de acción, se les han asignado los nombres de *E. coli* enterotoxigénica (ECET), *E. coli* enteropatógena (ECEP), *E. coli* enteroinvasiva (ECEI), *E. coli* enteroagregativa (ECEA), *E. coli* adherente-difusa (ECAD) y *E. coli* enterohemorrágica (ECEH). (59)

ECET es probablemente el agente etiológico más frecuente de diarreas acuosas de índole bacteriano entre la población infantil de los países subdesarrollados y el más destacado responsable de la "diarrea del viajero". ECEP es una de las principales causas de diarrea infantil en los países en vías de desarrollo, aunque también

provoca brotes localizados en las guarderías de los países desarrollados en donde, adicionalmente, llega a originar epidemias en adultos. ECEI manifiesta menores incidencias que las anteriores, pero se encuentra muy relacionada bioquímica y genéticamente con *Shigella sp*, al grado de que comparte con este género su especial capacidad para invadir el intestino e inducir cuadros disenteriformes. ECEA se asocia a diarreas persistentes en los niños que habitan en países subdesarrollados, si bien tanto lo observado en diversos brotes como los estudios recientes realizados en voluntarios humanos, sugieren que también afecta a los adultos y que su distribución geográfica es mundial. ECAD corresponde a un grupo heterogéneo de microorganismos cuya relevancia aún se desconoce y sigue generando grandes polémicas. Finalmente, ECEH es responsable de numerosos brotes que implican a diferentes entidades clínicas, en países desarrollados tales como Japón, E.U.A. y el Reino Unido, aunque la presencia de este agente

causal también empieza a detectarse en algunos países en vías de desarrollo. (59)

Cabe subrayar cada una de las seis categorías diarreagénicas de *E. coli* cuenta con elementos genéticos particulares, lo cuales la diferencian de las cinco restantes. La tabla 1 hace referencia a dichas características distintivas.

ii. Definición de ECEH

El reconocimiento de ECEH surgió a partir de 2 importantes hallazgos; el primero fue realizado por Riley en 1983, después de llevar a cabo el análisis de 2 brotes epidemiológicos en los que la enfermedad se caracterizaba por severos dolores y calambres

abdominales, acompañados por diarrea acuosa y seguidos por evacuaciones muy sanguinolentas y una fiebre ligera o inexistente; el cuadro se clasificó como colitis hemorrágica (HC) y se asoció a la ingestión de hamburguesas mal cocidas en una cadena de restaurantes de comida rápida. Los coprocultivos practicados a los pacientes redituaron el aislamiento de una rara -hasta entonces- cepa de *E. coli* perteneciente al serotipo O157:H7. (23)

Tabla 1. Elementos genéticos que codifican para factores de virulencia en cepas de *E. coli* que causan diarrea al humano. (59)

Elemento	Presente en:	Fenotipo
Islas de patogenicidad (PAIs)¹		
LEE	ECEP, ECEH	Histopatología A/E
HPI	ECEA	Procuración de hierro
Tia-PAI	ECET	Invasión
Islote EspC	ECEP	Enterotoxina EspC
Plásmidos de virulencia		
EAF	ECEP	Regulador de <i>pili</i> tipo IV
pO157	ECEH	Hemolisina, proteasa y toxina
ENT	ECET	Enterotoxinas ST y LT; <i>pili</i> CFAs y CSs
pAA	ECEA	Enterotoxinas EAST1 y Pet; fimbrias
Inv	ECEI	Invasión
Bacteriófagos		
Stxφ	ECEH	Toxinas Stx1 y Stx2
Transposones/elementos IS		
Tn1681	ECET	Enterotoxina ST
EAST1 IS	ECEH, ECEP, ECEA	Enterotoxina similar a la ST

¹ El término "isla de patogenicidad" se refiere a una región cromosómica cuyos productos son esenciales para la patogenicidad y que aparenta no pertenecer a la especie que lo contiene. Generalmente, se encuentra flanqueada por secuencias de repetición o elementos de inserción, además de contar con una proporción G/C.

La segunda observación "clave" fue efectuada por Karmali y cols en ese mismo año, quienes reportaron casos esporádicos de síndrome urémico hemolítico (HUS) en los que se detectaba tanto a una citotoxina como a la presencia de cepas de *E. coli* productoras de citotoxina, en la materia fecal de los enfermos. El HUS, definido por la aparición de una tríada de signos clínicos: falla renal, trombocitopenia y anemia hemolítica, ya se conocía en esa época, en la que también se sabía que era precedido por una diarrea sanguinolenta indistinguible del HC. (27, 39, 40)

De esta manera, 2 "claves" clínico-microbiológicas, la primera basada en el hallazgo de un raro serotipo de *E. coli* y, la segunda, fundamentada en la detección de una citotoxina específica, condujeron al reconocimiento de un nuevo y creciente agente patógeno causante de un padecimiento renal e intestinal. (40, 59)

El ensayo empleado para detectar la citotoxina había sido reportado desde 1977 por Konowalchuk y cols, cuyos informes hacían alusión a filtrados de cultivos líquidos de ciertas cepas de *E. coli* que provocaban un sorpresivo e irreversible efecto citopático en los cultivos de células Vero. Paralelamente, O'brien publicaba que los extractos de ciertas cepas resultaban citotóxicos para las células HeLa y que tal actividad podía ser neutralizada por anticuerpos dirigidos contra la toxina de Shiga (Stx), sintetizada por *Shigella dysenteriae* tipo 1; subsecuentemente, el mismo autor informó que varias cepas productoras de cuadros diarreicos liberaban una citotoxina muy similar a la Stx (SLT, de *Shiga-like toxin*) y que, inclusive, una de dichas cepas coincidía plenamente con la reportada por Konowalchuk, la cual sintetizaba toxina Vero. (40, 59)

Posteriormente, O'brien mostró que la SLT y la toxina Vero eran en realidad una misma y que las cepas 0157:H7 la producían casi invariablemente; asimismo, Johnson confirmó que ese serotipo había

sido aislado a partir de pacientes con HC en Canadá y que liberaba una citotoxina que actuaba sobre células Vero. Finalmente, Karmali y cols concretaron una publicación anual muy memorable, en la cual subrayaron que la SLT/toxina Vero era el factor de virulencia común entre el HC y el HUS, responsable del daño, tanto del tejido renal como del intestinal. (40, 59)

Tal como ha ocurrido con la mayoría de los microorganismos calificados como "patógenos emergentes", aún persiste la pregunta de si ECEH es realmente un nuevo agente etiológico, o bien, si su participación en las enfermedades provenía de tiempo atrás pero no se había podido detectar.

Después de reconocerse que el serotipo O157:H7 era la causa de HC, Los Centros de Control y Prevención de Enfermedades (CDC) de E.U.A. revisaron más de 3,000 cepas de *E. coli* -entre 1973 y 1983- y sólo encontraron un aislamiento de dicho microorganismo. Algo

similar ocurrió de 1978 a 1982 en el Reino Unido y en Canadá. (27, 40, 59)

En consecuencia, parece ser que la actual presencia del serotipo O157:H7 obedeció a un genuino incremento de su incidencia y no a una simple omisión anterior a 1982. Sin embargo, el HUS ya era una entidad clínica conocida antes de ese año; de hecho, desde su descripción inicial en 1955, durante los numerosos brotes se había propuesto la hipótesis de que su origen era viral o bacteriano; más tarde, aunque las cepas de *Shigella dysenteriae* tipo 1 productoras de Stx se habían asociado al padecimiento, lo cierto es que en muchos brotes epidémicos, los coprocultivos no revelaban su presencia, sino la de *E. coli*, de la cual sólo se consideraba que desempeñaba el papel benéfico que se le reconoce como flora intestinal. (40, 59)

El total desconocimiento de la realidad duró hasta 1968, cuando Kibel y Barnard sugirieron que una cepa mutante de *E. coli*, infectada por un bacteriófago, podía ser la responsable de la enfermedad en África. Posteriormente, en la década de los 80's, se demostró que la Stx era codificada por un bacteriófago de *E. coli* y que más de 100 diferentes serotipos de esta especie podían sintetizarla. (59)

Las cepas 0157:H7 se encuentran estrechamente relacionadas con la *E. coli* enteropatógena (ECEP) 055:H7, la cual es Stx-negativa; no obstante, aunque ECEP provoca muy numerosos casos de diarrea infantil en todo el mundo, su mecanismo de acción difiere en lo general del mostrado por ECEH, si bien ambas comparten su forma de adherencia al intestino y otros factores de patogenicidad.

En resumen, parece ser que las cepas *E. coli* Stx-positivas de otros serotipos han estado presentes durante varias décadas, pero fue

sólo debido a la emergencia de los 80's que se reconoció la existencia y la virulencia del O157:H7.

Desafortunadamente, el paralelismo de los trabajos que dieron lugar al descubrimiento de este microorganismo generó nomenclaturas diferentes, no sólo para una misma citotoxina: Stx, SLT, toxina Vero, etc. sino, inclusive, para el agente causal: VTEC (de *verotoxigenic E. coli*), STEC (de *Shiga toxin producing E. coli*), SLTEC (de *Shiga-like toxin producing E.coli*), etc. (59)

Es conveniente señalar que los términos VTEC y STEC son equivalentes, ya que ambos se refieren a cepas de *E. coli* productoras de una o más toxinas de la familia Stx; sin embargo, no está claro que la sola posesión de los genes *stx* confiera patogenicidad, dado que puede persistir la ausencia de otros factores de virulencia. Adicionalmente, el término "*E. coli* enterohemorrágica" (ECEH) fue acuñado para referirse a las cepas

que ocasionan HC y HUS, sintetizan Stx, causan lesiones de tipo A/E sobre las células epiteliales y poseen un plásmido de 60 MDa. En ese sentido, ECEH podría pertenecer a un subgrupo de STEC e incluye una connotación clínica que no está implicada en esta última: mientras no todas las STEC son patógenas, las ECEH sí lo son; por ello, en diversos trabajos recientes, se ha optado por emplear el término de "típicas ECEIT" para denotar a las cepas de STEC, tales como la O157:H7, y el de "atípicas ECEIT" para referirse a las STEC que no producen lesiones A/E y/o no poseen el plásmido de 60 MDa. (59)

II. PATOLOGÍA

i. Signos y síntomas generales

ECEH provoca un amplio espectro de manifestaciones clínicas que incluyen dolor abdominal, fiebre ligera o largos períodos afebriles

así como una diarrea que suele evolucionar hasta tornarse sanguinolenta. El cuadro puede cursar asintomático o sólo con diarrea y, en cuanto al desarrollo de las alteraciones extraintestinales, los reportes incluyen trastornos cardíacos y neurológicos asociados al síndrome urémico hemolítico (HUS) y a la púrpura trombocitopénica trombótica (PTT), cuyas consecuencias llegan a resultar fatales. (70, 83)

Generalmente, pocas bacterias patógenas están capacitadas para provocar todo el rango de síndromes clínicos que caracterizan a las cepas de ECEH causantes de HC y HUS. De hecho, la gran importancia de este microorganismo está reflejada en la respuesta de la comunidad de médicos e infectólogos hacia los estudios que en 1983 asociaron la producción de Stx (o toxina Vero) a la diarrea y al HUS; inclusive, las observaciones de Karmali fueron incluidas entre las contribuciones más significativas a la microbiología entérica de este siglo y representan uno de los principales hallazgos implicados en el HUS. (27)

Incuestionablemente, las investigaciones clínicas más extensas han incidido en ECEH O157:H7; sin embargo, aún se considera que algunos otros serotipos ocasionan cuadros patológicos indistinguibles de los debidos a aquél aunque, como grupo, los segundos figuran como agentes menos frecuentes de diarrea sanguinolenta y de HUS. (59)

Desde el punto de vista histopatológico, la infección por este microorganismo incluye hemorragia y edema en la lámina propia; sin embargo, estos mismos signos también aparecen en el colon ascendente y transversal, originando una imagen específica en las radiografías obtenidas a partir de enemas con bario; además, las biopsias colónicas de numerosos pacientes muestran necrosis focal e infiltración de polimorfonucleares (PMN's). Todas estas características semejan a las detectadas en la colitis enterohemorrágica ocasionada por *Clostridium difficile*, e inclusive,

pueden sumarse a ellas las clásicas pseudomembranas que "tipifican" a este último padecimiento. (59)

Una vez que ha atravesado el estómago, ECEH coloniza las regiones terminales del intestino en donde permanece limitada a la superficie de la mucosa (sin invadir de forma sistémica). Dentro del colon, los microorganismos se adhieren a las células epiteliales y se multiplican localmente, causando una clásica lesión estructural en la membrana de las células epiteliales superficiales (consultar más adelante lo referente al patrón "adherencia-efusión"). La producción de las citotoxinas Stx promueve la inflamación de la mucosa colónica, dando como resultado los exudados mucopurulentos y la presencia de sangre en las heces fecales. (59)

El período de incubación de la diarrea fluctúa entre los 3 y 4 días, aunque existen reportes aislados que citan 1 a 8 días. El síntoma inicial es la diarrea no sanguinolenta, si bien ésta puede ser

precedida de dolores y calambres abdominales, así como de una fiebre de corta duración acompañada por vómito. Uno o dos días después, el paciente suele experimentar la aparición de sangre en las evacuaciones y un dolor abdominal más intenso; a partir de esa etapa, la patología llega a prolongarse hasta por 4 a 10 días. (6, 17, 27, 42, 59, 66, 69, 79)

Finalmente, los exámenes inmunocitoquímicos muestran que los anticuerpos existentes en la submucosa pertenecen, de manera primaria, a las clases IgG, IgA e IgM.

ii. El modelo "adherencia-efusión"

Uno de los signos más destacados de las patologías debidas a este microorganismo consiste en la ocurrencia del fenotipo "adherencia-efusión" (A/E) que ECEH evidencia sobre la membrana celular del epitelio implicado, involucrando cambios que incluyen la acumulación

de actina polimerizada, actinina y miosina, por debajo de las bacterias adheridas. (31)

Es oportuno subrayar que, en realidad, este fenómeno se ha estudiado con mucha mayor amplitud en ECEP, en la que resulta más significativo que en ECEH, desde el punto de vista de sus respectivas patogenias.

En todo caso, ambas categorías de *E. coli* se asientan sobre estructuras proteicas semejantes a plataformas que se extienden formando pseudópodos a partir de las células epiteliales. Los pedestales se pueden tornar curvos u ondulados mientras se encuentran anclados a la superficie celular y las bacterias suelen moverse a lo largo de la superficie de los cultivos celulares, a medida que la actina se polimeriza. La lesión A/E también se ha detectado en procesos infectivos ocasionados por *Hafnia alvei* y *Citrobacter rodentium*. (32)

Es importante comentar que la histopatología A/E asociada a ECEH sólo se ha observado en cerdos gnotobióticos, en conejos infantiles y en cultivos de células epiteliales, infectados experimentalmente con *E. coli* O157:H7; es decir, aún no se ha comprobado la aparición de dicho fenotipo en especímenes clínicos humanos relacionados con ECEH, debido probablemente a que las biopsias del colon se obtienen en la fase tardía del padecimiento y, de acuerdo con lo que se conoce, las lesiones A/E sólo tienen lugar durante las fases tempranas, antes de que ocurran los daños asociados a la Stx. (59)

A este último respecto, cabe señalar que sólo es el obvio temor que generan las hemorragias -en el HUS y la HC- lo que conduce a la realización de biopsias colónicas.

iii. Entidades clínicas

ECEH funge como agente etiológico de diversas entidades clínicas, cuyas gravedades varían notablemente, en un espectro que incluye desde cuadros subclínicos hasta padecimientos con elevadas tasas de mortalidad. Las afecciones más relevantes son: infecciones asintomáticas, diarrea sin sangrado, colitis hemorrágica, síndrome urémico hemolítico y púrpura trombocitopénica trombótica. (6, 17, 27, 40, 59, 79, 84, 87)

No obstante, el serotipo O157:H7 de ECEH es indudablemente el de mayor importancia, considerando que provoca aproximadamente el 10 % del total de casos de diarrea no sanguinolenta, el 90 % de las HC, el 10 % de los HUS (en pacientes menores de 10 años) y menos del 5 % de las otras complicaciones entéricas y extraintestinales. (7, 36, 46, 59, 66)

A continuación se describen los principales aspectos clínicos de las enfermedades asociadas a ECEH.

- **Infección asintomática y diarrea sin sangre**

Los casos de infección asintomática por *E. coli* O157:H7 han sido detectados ocasionalmente en diversos brotes; sin embargo, su incidencia ha resultado difícil de ser estimada, debido principalmente a que las muestras fecales de las personas implicadas rara vez son recolectadas para su cultivo. (52, 70)

Eventualmente, se han reportado casos de diarrea sin sangre que evolucionan a CH. No obstante, los análisis microbiológicos practicados a las evacuaciones sin sangre -asociadas a brotes- han demostrado que la frecuencia de *E. coli* O157:H7 es relativamente pequeña. (70)

En general, los cuadros que cursan con diarrea no sanguinolenta presentan una menor severidad y pocas probabilidades de evolucionar a HUS o de provocar fallecimientos.

En contraste con lo anterior, los pacientes con deposiciones sanguinolentas experimentan diarrea, vómito y dolor abdominal, durante períodos más prolongados.

Tabla 2. Entidades clínicas ocasionadas por ECEH. (70)

Entidad clínica	Comentarios
Infección asintomática	Aparece en brotes y por contagio en casa. Su frecuencia y relevancia es desconocida.
Diarrea sin sangre	Cursa frecuentemente sin fiebre.
Colitis hemorrágica (HC)	Se evidencia severo dolor abdominal y diarrea sanguinolenta.
Síndrome urémico hemolítico (HUS)	Se caracteriza por una tríada de trastornos: anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia y daño renal agudo; afecta principalmente a niños de 1 a 5 años.
Púrpura trombocitopénica trombótica (PTT)	Ocurre en adultos, usualmente con fiebre y signos neurológicos. Generalmente no cursa con diarrea.

- **Colitis hemorrágica (CH)**

Sintomatología. En general, las infecciones por *E. coli* O157:H7 originan severo dolor abdominal -en el cuadrante inferior derecho-, náuseas, vómito, escalofríos y fiebre; esta última se presenta aproximadamente en la mitad de los casos y representa un signo menos consistente en la shigellosis, amibiasis, campilobacteriasis y los cuadros provocados por *E. coli* enteroinvasiva (ECEI). (17, 56, 59, 84)

Los análisis radiológicos y endoscópicos de la mucosa colónica muestran edema, erosión o hemorragia y las deposiciones evidencian ausencia de microorganismos entéricos convencionales. (83,86)

Este síndrome fue reportado en 1971, en referencia a cinco jóvenes adultos que desarrollaron colitis segmental reversible, de la cual los pacientes se recuperaron dos semanas después sin haberse administrado terapia específica alguna. El término "colitis

evanescente" fue empleado inicialmente para describir a esta entidad clínica y diferenciarla de las colitis ulcerativa, granulomatosa e isquémica. (39,40)

La HC por *E. coli* O157:H7 puede cursar como manifestación única o fungir como factor desencadenante del HUS. Por lo regular, la infección empieza abruptamente con severos dolores abdominales, a los cuales durante las siguientes horas sucede una diarrea acuosa que progresa hasta tornarse en totalmente sanguinolenta. Los síntomas intestinales, tales como náuseas y vómito, ocurren generalmente en forma temprana y suelen ser prominentes. (83)

El período de incubación de la HC varía entre 1 y 9 días (de 3.1 a 3.9 días en promedio) cuando se trata de brotes en la comunidad y, entre 1 y 14 días (de 4 a 8 días en promedio) dentro de las instituciones de salud. (59, 87)

Por lo regular, la atención médica se brinda 2 a 3 días después de iniciada la diarrea o el dolor abdominal, principalmente hasta que aparecen las deposiciones sanguinolentas -el síntoma más común de las infecciones por *E. coli* O157:H7-. La media de duración de la diarrea fluctúa entre los 3 y 7.5 días -siendo mayor en los enfermos pediátricos-, y los pacientes reportan un promedio de 10 a 11 movimientos intestinales durante el día más crítico. (83)

Datos de laboratorio. Los estudios de laboratorio suelen mostrar leucocitosis y, por lo regular, el hematocrito no declina significativamente, aunque las deposiciones sean notablemente sanguinolentas. Otros estudios incluyen valores normales de velocidad de sedimentación eritrocitaria, electrolitos séricos, funcionamiento hepático, tiempo de protombina y uroanálisis. Asimismo, el moco y los leucocitos pueden estar presentes en las deposiciones, aunque la cuenta correspondiente señala "de escasos a moderados". (83)

Finalmente, los exámenes colonoscópicos suelen sugerir el diagnóstico de colitis isquémica o enfermedad inflamatoria del intestino y las anomalías más notables se localizan en el colon ascendente y en el ciego. (83)

Factores de riesgo. En este rubro, destacan: la edad -puesto que las poblaciones infantil y gerontológica son más vulnerables-, los tratamientos antimicrobianos tardíos -en virtud de que éstos incrementan el riesgo de contagio "persona a persona" y las gastrectomías previas (aspecto sugerente de que la acidez gástrica puede desempeñar un papel protector relevante en la patogénesis). (70, 83)

- **Síndrome Urémico Hemolítico (HUS)**

Sintomatología. La mayoría de los pacientes con HUS evidencia pródromos gastrointestinales y diarrea con presencia o ausencia de

sangre -los síntomas más comunes-, que suelen acompañarse por dolor abdominal, vómito, fiebre y letargo, e inclusive, pólipos cecales, intususcepción (introducción del intestino delgado en el grueso) y apendicitis. (60, 70, 83, 87)

Descrito inicialmente por Gasser en 1955, representa la complicación más importante de la infección por *E. coli* O157:H7. Como se ha mencionado con anterioridad, es una entidad clínica caracterizada por anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia y daño renal agudo. Al parecer, sus principales factores predisponentes incluyen componentes de orden genético, el embarazo, la administración de diversos fármacos (tales como antibióticos, anticonceptivos orales y estrógenos), amén de la edad, las gastrectomías previas y otras causas de inmunocompromiso. (40, 74, 75)

Con base en datos epidemiológicos y de laboratorio, el síndrome aparenta dividirse en dos categorías: el típico o epidémico y el atípico o esporádico, aunque ambas ocurren de manera predominante en los recién nacidos y en los niños de corta edad -en quienes el daño renal agudo resulta más frecuente-. (17, 36, 40, 50, 59, 79, 84)

Datos de laboratorio y de gabinete. Las anormalidades radiográficas incluyen edema intestinal, acercamiento segmental transitorio y estenosis intestinal en tanto que, la sigmoidoscopia, puede mostrar ulceración rectal, colitis pseudomembranosa y difusa, ciego y colon ascendente envueltos, hemorrágicos y necrosados. (40)

Las complicaciones gastrointestinales más comunes del HUS incluyen inflamación inespecífica, colitis isquémica crónica con estrechez colónica y una necrosis global que conduce a la

perforación del colon, prolapso rectal y megacolon tóxico. Aunque el sistema nervioso central (SNC) no suele formar parte de los trastornos asociados al HUS, las alteraciones neurológicas pueden ocurrir en 30 a 50 % de los pacientes, abarcando irritabilidad y letargo, e inclusive, el coma. (60)

Si bien *E. coli* O157:H7 es el principal agente etiológico del HUS en Norteamérica, Canadá, Japón y Europa, su participación en la patología también ha venido detectándose recientemente en países en vías de desarrollo tales como Argentina y Chile. (60)

El HUS aparece abruptamente, 5 a 10 días después de haber iniciado la diarrea y, por lo regular, el diagnóstico se establece desde los 6.5 a 7.7 días posteriores a las primeras manifestaciones intestinales. (26)

El uso prolongado de agentes antidiarreicos también se ha propuesto como un factor de riesgo; sin embargo, los más claros son la inmunidad preexistente, el tamaño del inóculo y la virulencia de la cepa; en este último sentido, la probabilidad crece cuando se trata de clonas que presentan los genes asociados a la Stx2, la cual es considerada más peligrosa que la Stx1. (70, 71)

Es decir, la patogenia de este síndrome se relaciona con la producción de Stx, que origina varias alteraciones en el endotelio - aumento en la adherencia de los leucocitos, producción de endotelina y pérdida del óxido nítrico endotelial-, favoreciendo la vasoconstricción y la lisis endotelial (provocada por la participación de citocinas tales como el TNF- α). Al parecer, la toxina Shiga promueve que el riñón sintetice TNF- α y éste potencia los efectos de las endotoxinas, estimulando lesiones endoteliales que originan trombosis, vasoconstricción y, por lo tanto, la microangiopatía característica del cuadro global; además, la Stx también se une a los

eritrocitos, activa los monocitos e interfiere la función plaquetaria.
(40, 70, 87, 89)

En apariencia, el HUS es una patología no recurrente, tal como lo demuestra un estudio realizado en Utah, en el cual se observó que sólo el 2.6 % de los enfermos sufrieron dos veces de la enfermedad (la segunda de ellas sin la previa aparición de diarrea); estos últimos datos sugieren una eficacia plena de la inmunidad adquirida durante la primera afectación aunque, en el pequeño grupo que experimentó una recaída, es claro que aquélla resultó insuficiente para neutralizar la reinfección por ECEH y la acción de su citotoxina. (60)

El aislamiento del microorganismo a partir de las regiones extraintestinales resulta muy improbable, aunque ocasionalmente se ha logrado concretar mediante cultivos de orina, de sangre y de las glándulas del pene; recientemente, Tarr y cols detectaron una cepa Stx positiva de *E. coli* O103:H2 que provenía del tracto urinario y,

sorprendentemente, no ocasionaba diarrea al enfermo; este caso, en el cual ocurrió la evolución a HUS, sugiere que el epitelio urinario también permite la absorción de la Stx. (83, 87)

- **Púrpura trombocitopénica trombótica (PTT)**

Sintomatología. El cuadro suele presentarse con hemorragia diseminada, incluyendo petequias, equimosis y hemorragias retinianas y gastrointestinales; adicionalmente, desde el punto de vista de sus trastornos neurológicos, éstos incluyen síndrome mental orgánico, paresia, disfasia, habla intermitente, cefalea, vértigo y crisis convulsivas. Por lo que respecta a las alteraciones renales, por lo general éstas son progresivas y se caracterizan por hematuria, proteinuria y concentración elevada de nitrógeno ureico en sangre (BUN). (70)

En resumen, esta entidad clínica agrupa cinco síntomas: trombocitopenia, anemia hemolítica microangiopática, fiebre, daño renal agudo y alteraciones neurológicas; de hecho, representa la forma más extensa dentro del espectro de afecciones vasculares implicadas en el HUS, e inclusive, abarca daños neurológicos. (70)

Sin embargo, es importante establecer que la PTT también puede ser provocada por diversos fármacos, toxinas y agentes infecciosos, así como por el embarazo y varias enfermedades inmunológicas. En concreto, la infección por *E. coli* O157:H7 sólo se ha asociado a algunos casos de PTT, ocurridos principalmente en adultos. (70)

Datos de laboratorio. Invariablemente, se detecta una clara trombocitopenia (menos de 50,000 plaquetas/ μ l), los frotis de sangre periférica muestran anemia hemolítica microangiopática [eritrocitos fragmentados (esquistocitos), células espinosas

(equimocitos), eritrocitos en forma de casco y normoblastos], la prueba de Coombs es negativa y se evidencia una gran reticulocitosis. En las etapas tempranas de la enfermedad, las pruebas de laboratorio no indican coagulación intravascular diseminada (CID) aunque, conforme progresa la enfermedad, puede ocurrir una descompensación hepática o renal y aparecer sepsis.

(70)

Los trombos hialinos ocluyen arteriolas y capilares en casi todos los tejidos, lo cual representa la lesión anatomopatológica característica de la PTT. Aún cuando es posible observar la proliferación de células endoteliales en la proximidad de las lesiones, no aparecen reacciones inflamatorias ni vasculitis. Se cree que el material hialino consta de densos agregados plaquetarios, rodeados por capas delgadas de fibrina. (83)

iv. Epidemiología

Algunos datos epidemiológicos. Las incipientes características epidemiológicas establecidas en la actualidad implican la posibilidad de que el intestino del ganado represente un reservorio natural de ECEH y que, consecuentemente, los alimentos derivados de los animales infectados constituyan uno de los principales focos infecciosos para el humano, junto con los portadores y otros individuos convalecientes. (27, 59)

Sin lugar a dudas, los grandes brotes epidémicos llegan a afectar a cientos de personas, aunque no debe soslayarse el hecho de que también llegan a ocurrir casos esporádicos de infección por ECEH. (27)

Si bien la frecuencia de *E. coli* O157:H7 es muy importante en Norteamérica, Europa y Japón, zonas desarrolladas que se encuentran en el hemisferio norte, su incidencia se ha venido incrementando en algunos países del hemisferio sur, tales como Argentina, Australia, Chile y Sudáfrica. (54, 59, 68, 77, 85)

El CDC estima que el número de afecciones ocasionadas por *E. coli* O157:H7 rebasa en E.U.A. los 20,000 casos anuales, de los cuales 250 culminan con el fallecimiento del paciente; no obstante, es claro que las deficiencias diagnósticas llegan a enmascarar las tasas reales. En algunas regiones, la incidencia de dicho serotipo es sustancialmente mayor que el de *Shigella spp* y alcanza el segundo o tercer sitio, superada sólo por las asociadas a *Campylobacter* y/o *Salmonella*, aunque el microorganismo es casi siempre el de mayor frecuencia cuando las evacuaciones analizadas evidencian considerables cantidades de sangre. (59)

Por otra parte, algunos trabajos sugieren que el serotipo O157:H7 ocasiona entre el 50 y 80 % de todos los cuadros causados por cepas de ECEH.

Recientemente, el CDC implantó la "Red de vigilancia activa de padecimientos de origen alimentarlo (FoodNet)", para asumir el control de las enfermedades intestinales en E.U.A. Los resultados obtenidos en 1996, primer año de actividad del FoodNet, aportaron una información muy relevante para aquel país: las tasas (por cada 100,000 habitantes) calculadas para los principales agentes etiológicos fueron las siguientes: 25 para *Campylobacter spp*, 16 para *Salmonella spp*, 9 para *Shigella spp*, 3 para *E. coli* O157:H7, 1 para *Yersinia spp*, 0.5 para *Listeria spp* y 0.2 para *Vibrio spp*. (59)

Las cifras anteriores correlacionan relativamente con estimaciones posteriores, ya que éstas ubican a *E. coli* O157:H7 como el cuarto agente etiológico de padecimientos originados por alimentos en E.U.A. (59)

Por su parte, es incuestionable que, en los países en vías de desarrollo, el aislamiento de ECEH es menor que el de otras cepas de *E. coli* productoras de diarrea, tales como ECET y ECEP, cuyas respectivas incidencias continúan siendo muy elevadas, sobre todo dentro de la población infantil. (59)

Cabe señalar que, además de aislarse a partir de vegetales y carne mal cocida, el serotipo O157:H7 se ha detectado en otros alimentos, tales como mayonesa, jugo de manzana no pasteurizado y salami fermentado, comprobándose que este microorganismo desarrolla sin problemas a pH's ácidos. (40, 57)

Lógicamente, en los casos de frutas y legumbres, se piensa que la causa de la transmisión es su previa contaminación con la materia fecal del ganado. Dos brotes recientes en Virginia y Michigan fueron asociados al consumo de germinados de alfalfa, cuyas semillas habían sido adquiridas al mismo distribuidor. (59)

Por obvio, los sistemas municipales de agua también han fungido como focos infecciosos de epidemias, ligados principalmente a fallas en la cloración; no obstante, también se han reportado brotes originados en el agua de alberca: en Oregon, ocurrió una epidemia de HC y HUS, encontrándose que el serotipo O157:H7 afectaba a 21 individuos que habían nadado en un lago. (27)

De acuerdo con los últimos comentarios y con numerosos estudios realizados en voluntarios humanos, la virulencia de esta cepa es tan elevada como la de *Shigella*: sólo se requiere ingerir entre 10 y 100 bacterias para que el individuo enferme. (59)

Adicionalmente, la sobrevivencia de ECEH en los pacientes infectados aparenta ser muy variable: en un estudio realizado en Seattle, las heces del 66 % de enfermos de HUS manifestaban inicialmente la presencia del microorganismo pero, 7 días después, las muestras recientes de los mismos individuos resultaron

negativas, aún en ausencia de antibiótico-terapia. En contraste, un trabajo efectuado en Minnesota mostró que el agente causal continuaba siendo liberado en las heces de los enfermos pediátricos durante 2 a 62 días, con una media de 17, mientras que, en Alemania, la media calculada para enfermos de HUS fue de 21 días, con un rango de 5 hasta 124 días. (59)

Transmisión. ECEH puede ser transmitida -primariamente- tal como ocurre en las zoonosis (de los animales infectados al ser humano), por ingestión de alimentos contaminados y de persona a persona (por vía oral-fecal), ya que diversos brotes de diarrea se han originado en guarderías, escuelas, asilos de ancianos, etc. (12, 27, 70)

E. coli O157:H7 se ha aislado a partir de agua contaminada, ganado vacuno, borregos, caballos, perros, carne de puerco, carnero (59), venado , pollo, mariscos, leche bronca, lechuga (4), mayonesa (39),

jugo de manzana no pasteurizado (57) y salami fermentado,entre otros .

Cabe subrayar que, en E.U.A., la ingestión de hamburguesas mal cocidas (preparadas en casa o en restaurantes) ha resultado un factor desencadenante de numerosos brotes epidémicos, debido a que esta clase de alimentos deriva de procedimientos modernos que no garantizan su debida cocción, independientemente de que la carne de miles de reses procedentes de cientos de granjas suele molerse en forma conjunta, antes de ser distribuida a todos los restaurantes de una misma cadena -localizados en varios estados del país-. (59)

Análogamente, en Japón, particularmente en las ciudades de Sakai, Yokohama y Gamagori, ocurrieron diversos brotes que implicaron durante 1996 y 1997 a más de 9,000 individuos afectados; al

parecer, la mayoría de los casos se relacionaba con la ingesta de rábanos (44, 86)

El uso de fertilizantes naturales puede explicar los brotes de infección por *E. coli* O157:H7 asociados a la ingesta de jitomates crudos, si bien la contaminación de los cultivables también suele deberse a que los animales infectados pastan y defecan en los mismos campos. (25)

v. Serotipos no-O157:H7

El hecho de que las cepas O157:H7 hayan ocasionado la mayor parte de los brotes epidémicos asociados a ECEH, sugiere que dicho serotipo es el más virulento y/o el más transmisible. No obstante, otras cepas de *E. coli* Stx-positivas también han sido implicadas tanto en brotes epidémicos como en casos esporádicos y el incremento en su incidencia no deja lugar a dudas. (59)

La estimación de la verdadera frecuencia de las enfermedades causadas por estas cepas es muy complicada, dada la necesidad que implica detectar la producción de Stx y de emplear medios con sorbitol cuya existencia comercial es prácticamente nula. Además, distinguir a los patógenos dentro de este grupo no resulta fácil, ya que no basta con que la cepa produzca Stx para que se le califique como virulenta, puesto que la capacidad para provocar padecimientos requiere de factores adicionales de patogenicidad. (59)

En resumen, las revisiones enfocadas específicamente a los serotipos no-O157:H7 de ECEH han logrado establecer lo siguiente:

- Más de 200 serotipos son Stx-positiva, pero la mayoría de ellos también abarcan cepas Stx-negativa. No obstante, el gran total incluye alrededor de 50 serotipos asociados a diarrea sanguinolenta y al HUS en humanos.(59)

- Los serotipos no-O157:H7 que se relacionan más frecuentemente con padecimientos en humanos son el O26:H11, O103:H2, O111:NM y O113:H21, los cuales han originado más de 10 brotes, en Japón, Alemania, Italia, Australia, la República Checa y E.U.A., involucrando entre 5 y 234 individuos. (59)
- Si bien se ha sugerido que estos serotipos ocasionan el 20 a 25 % de los casos de HUS en Norteamérica, cabe considerar que, en países tales como Chile, Argentina, y Australia, representan el principal agente etiológico de dicha enfermedad. (59)
- Las cepas no-O157:H7 también originan diarrea no sanguinolenta: un estudio belga determinó que 62 % de los aislamientos fecales Stx-positiva pertenecían a este grupo y que sólo el 32 % correspondía al O157:H7; en Seattle, las cepas no-O157H7 constituyeron el 1.1 % del total de los aislamientos clínicos provenientes de evacuaciones, cifra que supera a los de

Shigella y *Yersinia spp* (0.2 % en ambos casos), aunque no a los de *Salmonella* (3.4 %) ni a los de *E. coli* O157:H7 (2.9 %). (59)

- La reciente incorporación de equipos comerciales para detectar a las cepas de *E. coli* Stx-positiva, facilitará la estimación de la real incidencia de estos serotipos en el futuro cercano. (59)

III. FACTORES DE VIRULENCIA

Sin lugar a dudas, la mayor parte de los trabajos tendientes a determinar los factores de virulencia de ECEH se han enfocado primordialmente al estudio de la Stx, la cual se encuentra codificada por el bacteriófago Stx ϕ , que se encuentra insertado en el cromosoma bacteriano; empero, es oportuno tomar en cuenta que otros importantes factores de patogenicidad también están codificados en el cromosoma y, adicionalmente, en el plásmido de

Shigella y *Yersinia spp* (0.2 % en ambos casos), aunque no a los de *Salmonella* (3.4 %) ni a los de *E. coli* O157:H7 (2.9 %). (59)

- La reciente incorporación de equipos comerciales para detectar a las cepas de *E. coli* Stx-positiva, facilitará la estimación de la real incidencia de estos serotipos en el futuro cercano. (59)

III. FACTORES DE VIRULENCIA

Sin lugar a dudas, la mayor parte de los trabajos tendientes a determinar los factores de virulencia de ECEH se han enfocado primordialmente al estudio de la Stx, la cual se encuentra codificada por el bacteriófago Stx ϕ , que se encuentra insertado en el cromosoma bacteriano; empero, es oportuno tomar en cuenta que otros importantes factores de patogenicidad también están codificados en el cromosoma y, adicionalmente, en el plásmido de

60 MDa cuya presencia caracteriza a todas la ECEH del serotipo O157:H7. (9, 55,58,59, 65,72,76, 82)

Desafortunadamente, las respuestas celulares que se traducen en la histopatología A/E asociada a ECEH no han sido analizadas tan extensamente como las que dan lugar a dicho fenotipo en ECEP; sin embargo, también suelen evidenciarse niveles importantes de calcio intracelular y elevadas concentraciones de actina polimerizada en las mucosas colonizadas por ECEH. En lo que sí se observan relevantes diferencias respecto a los fenómenos originados por ECEP, es en el hecho de que ECEH no promueve la fosforilación de la tirosina en las proteínas embebidas en las células epiteliales y en que las cepas ECEH *eae*-negativas (que, por ende, carecen del LEE - *locus of enterocyte effacement*-) provocan incremento del calcio intracelular aunque no originen el fenotipo A/E en las células eucariotes; esta última característica demuestra que sí existen

distinciones entre las respuestas celulares dirigidas hacia ambas clases de microorganismos. (34, 59)

Cabe mencionar que la isla de patogenicidad LEE, la cual a su vez es responsable de la expresión de la histopatología A/E, ha sido debidamente localizada tanto en ECEP como en ECEH y contiene a los genes que codifican para la intimina, para las proteínas EspA y EspB, e inclusive, para el denominado sistema de secreción proteica tipo III, mismo que desempeña el esencial papel de trasladar y excretar a las moléculas proteicas cuyo papel resulta fundamental en la adherencia e internalización bacterianas. (20, 29, 59)

Tal como sucede en ECEP, el serotipo O157:H7 induce una respuesta inflamatoria aparentemente relacionada con el fenotipo A/E. Durante un estudio realizado en conejos, se pudo bloquear experimentalmente la infiltración de PMN's mediante la adición de anticuerpos anti-CD18, pero ello sólo redujo la diarrea -sin

eliminarla totalmente-; lo anterior debe tomarse en cuenta, ya que se han detectado cantidades notables de IL-8 en respuesta a las infecciones por ECEH. (30, 59)

Toxinas de Shiga

La Stx constituye el principal factor de patogenicidad y la característica distintiva de ECEH, ya que se trata de la razón del fallecimiento de numerosos pacientes y de diversos síntomas de las enfermedades asociadas al microorganismo. (49, 59)

Estructura y genética. La familia de las toxinas Stx contiene 2 miembros principales que no cruzan inmunológicamente, denominados Stx1 y Stx2; una misma cepa puede sintetizar uno de ellos o ambos, e inclusive, múltiples variantes de Stx2. (53, 61)

La Stx1 es idéntica a la toxina producida por *Shigella dysenteriae* tipo 1, excepto en algunos casos en los que se aprecia un residuo de

diferencia; los prototipos Stx1 y Stx2 manifiestan una identidad de sólo 55 y 57 % en las subunidades A y B, respectivamente. (59)

Por otra parte, las variantes de Stx2 han recibido los nombres de Stx2c, Stx2v, Stx2vhb, Stx2e, etc. aunque, dependiendo del autor, la denominación Stx puede ser sustituida por VT (de *Vero toxin*), en cuyo caso se habla de la VT2c, VT2v, etc. (59)

La estructura A-B se encuentra conservada en toda la familia Stx y en el prototipo de sus miembros, la toxina de Shiga; la subunidad única A puede ser escindida proteolíticamente, produciendo un fragmento A1 de 28 kDa, y otro (A2) de 4 kDa, los cuales previo a la ruptura correspondiente permanecen juntos a través de un puente disulfuro. Además, el péptido A1 es el que posee la actividad enzimática en tanto que, el A2, es responsable de la unión de la subunidad A al pentámero que integra la subunidad B; dicho pentámero es, por cierto, la molécula que se fija a la célula "blanco",

particularmente a su receptor específico, el glucolípido Gb3, presente en las células eucariotes. (59, 61)

Si bien el receptor de la gran mayoría de las Stx es el glucolípido Gb3, el de la Stx2e es el Gb4; en este sentido, la Stx2e se relaciona con el edema en cerdos, más que con diarrea en humanos aunque, ocasionalmente, algunas cepas que expresan esta variante se han aislado a partir de pacientes con HUS o síndrome diarreico. (59, 61)

Una vez que la toxina se ha fijado a su receptor, es endocitada y transportada al aparato de Golgi y, posteriormente, hasta el retículo endoplásmico rugoso. (61)

Finalmente, la subunidad A pasa al citoplasma de la célula eucariote, en donde ejerce su acción sobre la subunidad ribosomal 60S; específicamente, el péptido A1 corresponde a una N-glucosidasa que elimina un solo residuo de adenina del RNA 28S de los ribosomas,

con lo cual inhibe la síntesis proteica. (59, 61)

Evidentemente, el bloqueo de la síntesis proteica conduce a la muerte de las células endoteliales del riñón, de las células epiteliales del intestino y, desde luego, de las HeLa, Vero o de cualquiera otra que presente el receptor Gb que corresponda. (59)

Es importante subrayar que los genes estructurales para Stx1 y Stx2 se ubican en bacteriófagos temperados, exceptuando a los que codifican para Stx2c, que se localizan en el cromosoma. (59)

La producción de Stx1 por parte de *E. coli* y *S. dysenteriae* puede ser reprimida por el hierro y por bajas temperaturas, factores ambos que, por cierto, no afectan la síntesis de Stx2. (59)

Cabe mencionar que algunos reportes de la década de los 80 sugirieron que algunas cepas de *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*,

Campylobacter jejuni, *E. coli* K-12 y *E. coli* de la flora habitual, liberaban bajos niveles de alguna Stx; no obstante, los datos no pudieron ser confirmados y, actualmente, sólo se acepta que, además de *Shigella* y ECEH, muy contadas cepas de *Citrobacter freundii* y *Enterobacter spp* elaboran Stx2 y cuentan con genes *stx2* homólogos a los detectados en ECEH. (18, 59)

El papel de la Stx en la enfermedad intestinal

Numerosos datos muestran la implicación de la Stx en los cuadros de diarrea y enterocolitis, incluidos algunos que demuestran que, en su forma purificada, esta toxina puede ocasionar acumulación de fluidos y daños histológicos en asas intestinales ligadas. A este respecto, el posible mecanismo de la secreción de fluidos involucra la muerte selectiva de las células que contienen a los vellos absortivos: en el íleon de conejo, el receptor Gb3 se encuentra más concentrado en las células vellosas que en las secretoras, por lo que

la destrucción de las primeras inclina el balance hacia una secreción neta. Esta evidencia sugiere que, a diferencia de la TL (de ECET) y la CT (de *V. cholerae*), la Stx no promueve la secreción activa de iones Cl⁻; además, la administración intravenosa de Stx1 o Stx2 purificadas provoca diarrea no sanguinolenta, lo que propone otros mecanismos diarreagénicos y la unión de la toxina a las células vellosas (vellosidades). (53, 59)

Otros argumentos sobre el papel de la Stx en el síndrome diarreico provienen de estudios realizados con mutantes de otros agentes patógenos; en este sentido, Sjogren y cols emplearon un patógeno natural de conejos, *E. coli* RDEC-1, que causa diarrea no sanguinolenta y lesiones A/E, posee el *locus* LEE y no produce Stx; dichos autores insertaron un bacteriófago que expresaba Stx1 a la cepa RDEC-1 y la inocularon oralmente en conejos jóvenes, provocándoles un cuadro mucho más severo que el asociado a la cepa

original, con graves lesiones histológicas que incluían cambios vasculares, edema y un intenso proceso inflamatorio. (59)

Análogamente, Fontaine y cols administraron oralmente a monos una mutante de *S. dysenteriae* tipo 1 carente de los genes *stx*, con la cual indujeron en el animal una diarrea común, mucho más leve que la promovida en otro lote inoculado con una cepa *Stx*-positiva. (59)

Aunque en ambos casos se obtuvo un volumen similar de evacuaciones líquidas, en los monos relacionados con la cepa *Stx*-positiva se generaron especímenes muy sanguinolentos y se observó una gran destrucción de vasos y capilares en el tejido conectivo de la mucosa colónica. (59)

El significado de la *Stx* en los cuadros intestinales puede diferir dependiendo del modelo animal utilizado: en los lechones, la presencia o ausencia de *Stx* no parece ser relevante en la severidad

de la patología, mientras que la extensión y la distribución de las lesiones A/E sólo resultaron importantes para determinar las características del cuadro. En conejos pequeños, la administración oral de una mutante O:157:H7 Stx-negativa, mostró los mismos cambios en la absorción y la secreción iónicas que los observados en un lote análogo inoculado con O157:H7 Stx-positiva; en este último modelo, el desarrollo del fenotipo A/E y la infiltración de PMN's en los tejidos intestinales resultó crucial en el desarrollo del síndrome diarreico. (59)

La conclusión que abarca todos los estudios realizados en los diferentes modelos es la siguiente: la capacidad de ECEH para provocar lesiones A/E es probablemente suficiente para generar el síndrome diarreico, pero la Stx es esencial para el desarrollo de HC y de diarrea sanguinolenta. (6, 36, 61, 66, 69, 81)

La Stx y el HUS

Aunque probablemente la Stx producida en el intestino sea absorbida hacia la circulación, aquélla nunca se ha podido detectar en la sangre de los enfermos de HUS; de hecho, en las células epiteliales cultivadas *in vitro*, la toxina se traslada a través del epitelio sin sufrir ruptura alguna, quizá mediante una vía transcelular y no paracelular. En este sentido, es probable que el daño de la mucosa intestinal por la Stx, el LPS y otros mediadores de la inflamación promuevan la translocación de la toxina hacia la circulación, ya que los pacientes con diarrea sanguinolenta asociada al O157:H7 sufren de HUS con mayor frecuencia que aquéllos cuyas evacuaciones no presentan sangre. (61)

Si bien no se cuenta con un modelo animal que reproduzca las características histopatológicas renales del HUS -las cuales aparecen después de la administración intestinal de la Stx- la

inoculación endovenosa de Stx1 o Stx2 en conejos provoca lesiones en el intestino y el SNC -que contienen altas concentraciones del receptor Gb3-. No obstante, es preciso aclarar que, a diferencia del riñón humano, el de los conejos no manifiesta alteraciones, ya que este último carece de Gb3. (59)

Adicionalmente, la Stx es citotóxica *-in vitro e in vitro-* para las células endoteliales del riñón humano: la típica histopatología renal incluye edema en las células del endotelio glomerular y la deposición de plaquetas y fibrina dentro del glomérulo. A este respecto, las lesiones endoteliales debidas a la Stx conducen al estrechamiento de la luz de los capilares y a la oclusión de los vasos glomerulares, a través de la acumulación de plaquetas y fibrina; a continuación, aparecen dos signos que caracterizan al HUS: la reducción en el grado de filtración glomerular ocasiona la falla renal y la mayor fricción de los eritrocitos con las paredes vasculares ocluidas genera la fragmentación de dichas células rojas. (47, 48, 59)

Los estudios epidemiológicos indican que la Stx2 es más importante que la Stx1 en el desarrollo del HUS; sin embargo, las observaciones implicadas resultan un tanto sorprendentes, ya que establecen que las cepas O157:H7 que sólo sintetizan Stx2 se encuentran más relacionadas con el padecimiento que las que elaboran Stx1, o bien, ambas. (59)

La polémica sobre el particular se enriquece con otros estudios cuya estadística no coincide con la que dio lugar a la afirmación anterior; empero, algunos trabajos realizados en células endoteliales renales y en ratones han demostrado que la Stx2 es más citotóxica que la Stx1 aún cuando, como se ha mencionado, la primera en realidad corresponde a toda una serie de variantes, cuyas diferencias en la subunidad A pueden implicar una mayor letalidad en ratones -habida cuenta de que, inclusive, algunas de ellas son activadas por el moco intestinal-. (59)

En cualquier caso, el mecanismo que explica la aparición del HUS implica directamente la acción de la Stx sobre las células endoteliales del riñón; no obstante, diversos trabajos también acreditan un papel importante a las citocinas. Varias observaciones permiten establecer que la Stx induce la expresión de citocinas proinflamatorias tales como la TNF- α y la IL-6 en los macrófagos peritoneales murinos y la TNF en el riñón; el TNF- α y la IL-1 β pueden mejorar *in vitro* el efecto citotóxico de la Stx sobre las células endoteliales vasculares humanas y, tanto esas dos citocinas, como el TNF- β y el LPS bacteriano, promueven la expresión de Gb3 e incrementan la unión de la Stx a dichas las células endoteliales.

(38, 43, 59)

De acuerdo con los estudios clínicos, se encuentran elevados niveles de IL-6 en el suero y la orina de los pacientes con HUS, e inclusive, esos niveles de la citocina correlacionan con la gravedad del cuadro.

(59)

Evidentemente, la información anterior sobre las citocinas confirma la alta probabilidad de que éstas desempeñen una función indirecta en el origen y evolución del HUS, aunque aún resulta necesaria la realización de mayores estudios que confirmen esta versión.

Enterotoxina EAST1

Esta toxina, descrita inicialmente como producto de ECEA (EAST1 = toxina termoestable 1 de *E. coli* enteroagregativa), también se ha detectado en ECEH: de las 75 cepas O157:H7 analizadas en un mismo trabajo, todas evidenciaron contar con dos copias cromosómicas del gen *astA* (que codifica para EAST1); esta misma observación se repitió en 8 de 9 cepas de *E. coli* O26:H11 y en 12 de 23 cepas que no correspondían a alguno de los dos serotipos mencionados. (45, 59)

El significado de la EAST1 en la patogénesis de las enfermedades ocasionadas por ECEH es aún desconocido, si bien no puede descartarse la posibilidad de que su participación sea trascendental en algunos de los frecuentes casos de diarrea no sanguinolenta que se han detectado en personas infectadas por el microorganismo.

(59)

Enterohemolisina

El plásmido de 60 MDa encontrado en las cepas de *E. coli* O157:H7 también contiene los genes que codifican para la enterohemolisina.

Por ejemplo, en Alemania, aproximadamente el 90 % de las cepas Stx-positivas aisladas de pacientes poseían los genes correspondientes y, según otro estudio, en el que se investigaron cepas O:111H- Stx-positivas, el 88 % de las cepas causantes de HUS dio lugar al mismo

fenotipo, a diferencia del 22.2 % de las que provenían de casos de diarrea común. (15, 67)

Cabe mencionar que los pacientes con HUS producen anticuerpos anti-enterohemolisina, pero aún no se cuenta con datos que aseguren la participación activa de esta hemolisina en el padecimiento. (59)

El gen que codifica para su síntesis, *ehxA*, podría desempeñar algún papel en la lisis de los eritrocitos, a fin de que estos liberen los grupos heme y la hemoglobina, ya que se ha comprobado que esta clase de moléculas mejora el crecimiento del serotipo O157:H7. En tal contexto, otras dos hemolisinas codificadas en bacteriófagos, denominadas Ehly1 y Ehly2, son producidas por numerosas cepas de *E. coli* productoras de Stx. (78)

El gen *ehxA*, muestra aproximadamente un 60 % de similitud con el gen *hlyA*, el cual codifica para la hemolisina expresada por las cepas uropatógenas de *E. coli*. (78)

Factores de adherencia intestinal

Gen *eae*

La única adhesina de *E. coli* O157:H7 cuyo papel *in vivo* se ha comprobado plenamente en modelos animales, corresponde a una intimina de 94 a 97 kDa, codificada por el gen *eae*. (59, 90)

En lechones convencionales y gnotobióticos, dicho serotipo produce extensas lesiones A/E en el intestino delgado, como reflejo de la adherencia íntima del microorganismo a las células epiteliales. (59)

El gen *eae* presenta dos subunidades: la *eaeA* y la *eaeB*. Por lo que respecta a la primera, ésta es necesaria (aunque insuficiente) para producir la lesión A/E en los enterocitos y, al parecer, codifica para la intimina -una proteína de membrana externa (OMP) de 97 kDa-

que, al unirse a sus receptores en la superficie de las células eucariotes, funge como soporte de los filamentos de actina. (19, 58)

En cuanto a la *eaeB*, ésta codifica para la secreción de una proteína de 37 kDa, la cual está implicada en el mecanismo disparador de la transducción y fosforilación de la tirosina en la célula hospedera. (59)

Cabe señalar que las cepas O157:H7 con mutaciones en el gen *eae* producen fenotipos A/E menos extensos y no colonizan cualquier región intestinal. Otros hechos que refuerzan la trascendencia de la intimina son: los enfermos con HUS presentan anticuerpos anti-intimina y la virulencia de las cepas de ECEP (analizadas en voluntarios humanos) se pierde o disminuye notablemente cuando se han producido mutaciones en el gen *eae*. (59)

Evidentemente, los supuestos receptores para la intimina pueden variar dependiendo del serotipo y hasta se ha planteado la hipótesis

de que la secuencia implicada en cada uno explicaría porqué ECEP coloniza los intestinos grueso y delgado de los lechones, mientras ECEH sólo lo hace en el colon; de hecho, cuando el *eae* de ECEP se clona en mutantes ECEH carentes de dicho gen, la cepa resultante expresa la intimina de ECEP que origina el fenotipo A/E en ambas regiones intestinales y promueve un volumen notablemente mayor de las evacuaciones. (59)

Si bien los mencionados cambios de *eae* -entre ECEP y ECEH- son indicativos de la relevancia de la intimina en la colonización del intestino, aún debe establecerse si las fimbrias también desempeñan algún papel en la adherencia del serotipo O157: H7.

Los *pili* y otros posibles factores de adherencia diferentes a la intimina podrían ser trascendentales, considerando que otros serotipos Stx-positivos de *E. coli*, los cuales carecen del gen *eae*, también ocasionan diarrea o HUS en humanos. Asimismo, se ha comprobado que serotipos tales como el O113:H21 -que tampoco

presentan *eae*- se adhieren eficazmente a células epiteliales cultivadas *in vitro*. (67)

Evidentemente, se han detectado otras probables adhesinas de *E. coli* O157:H7, cuyos respectivos papeles aún no se han comprobado: Sherman y cols reportaron una proteína de membrana externa (OMP) de 94 kDa, distinta a la intimina, que mediaba la adherencia del microorganismo a las células epiteliales HEp-2. Por su parte, Tarr sugirió que una proteína homóloga a la IrgA -reguladora de hierro en *V. cholerae*- estaba implicada en la adhesión a células HeLa. Finalmente, se ha propuesto que las fimbrias tipo 1 cumplen alguna función en la adherencia, tomando como base que ésta se ha logrado inhibir experimentalmente al incorporar manosa. (67, 91)

Plásmido pOI57

Prácticamente todas las cepas O157:H7 poseen este plásmido de 92 a 104 kb, el cual también se encuentra presente en el serotipo O26:H11 y en casi todas las *E. coli* Stx-positivas de origen humano. Con relación a ello, uno de sus fragmentos de 3.4 kb que codifica para la enterohemolisina, fue seleccionado por Levine y cols para desarrollar una prueba de identificación de ECEH. (59)

El pOI57 también codifica para una proteasa EspP, para una catalasa-peroxidasa y, quizá, para diversos factores de adhesión y para el supresor de la síntesis de un exopolisacárido. (19)

Con respecto a su papel en la patogénesis de las enfermedades ocasionadas por ECEH, diversas publicaciones resultan contradictorias entre sí. Karch y cols (51) reportaron que el pOI57 era necesario para la expresión de las fimbrias y para la

adhesión del microorganismo a células epiteliales. Otros autores han difundido que su pérdida reduce la adhesión y algunos aseguran lo contrario. Dytoc y cols (34) publicaron datos obtenidos *in vivo* que sí asociaban el plásmido a la adherencia intestinal, previa inoculación microbiana de conejos adultos por vía oral; en este estudio, los investigadores inocularon *E. coli* K-12 HB101 con y sin el plásmido, y observaron que sólo aquellas cepas que lo contenían concretaban su adherencia. (59)

Desde el punto de vista de los análisis epidemiológicos, éstos sugieren una gran correlación entre la presencia del plásmido y el desarrollo del HUS: el fenotipo enterohemolítico codificado por el pO157 fue comprobado en el 88 % de las cepas O111:H- y sólo en el 22.2 % de la cepas del mismo serotipo que provenían de enfermos con diarrea pero sin HUS. (59)

Independientemente de la incertidumbre existente en cuanto a la trascendencia del plásmido en las patologías humanas, es incuestionable su gran distribución entre las cepas clínicas de ECEH. Por lo que se refiere a pacientes norteamericanos, el pO157 se detectó en el 99 % de los serotipos O157:H7, en el 77 % de las cepas O26:H11 y en el 81 % de otros serotipos Stx-positivos. En Europa, las cifras encontradas resultaron muy similares a las antes mencionadas.(59)

LPS

Recientemente, se ha demostrado que el LPS de las cepas O157 y el de muchas otras bacterias Gram negativas mejoran la citotoxicidad de la Stx sobre las células endoteliales de los vasos humanos; en este sentido, existe un reporte de que, con base en ello, *E. coli* O157:H7 invade los cultivos de líneas celulares intestinales, pero otra publicación posterior cuestiona tal hallazgo, estableciendo que

el mencionado serotipo no es más invasivo que las cepas de *E. coli* que constituyen la flora intestinal. (10, 42, 59)

Procuración de hierro

E. coli O157:H7 posee un sistema especializado de transporte de hierro que le permite utilizar la hemoglobina y otros grupos heme para cubrir sus requerimientos de dicho metal. Cuando el microorganismo se encuentra en condiciones limitadas de hierro, sintetiza una OMP de 69 kDa codificada por el gen *chua* (de *E. coli* *heme utilization*). Otro gen homólogo a ese también está presente en *S. dysenteriae* tipo 1, aunque no en otras especies de dicho género ni en cepas de *E. coli* O26:H1 u otros serotipos Stx-positivos. (13, 59)

Como el crecimiento de la O157:H7 es estimulado por la presencia del metal, la lisis de los eritrocitos debido a las hemolisinas de este

agente etiológico podría representar un factor que apoye el proceso infeccioso. (59)

IV. PREVENCIÓN y TRATAMIENTO

i. Medidas higiénicas de prevención

La disminución en la transmisión primaria de ECEH requiere que el individuo común conozca los riesgos asociados al consumo del agua no hervida, de la ingestión de carne mal cocida y de leche no pasteurizada. De hecho, es necesario que la carne se ingiera sólo si se ha cocido plenamente, es decir, cuando su aspecto implique una coloración gris y no rosa, ya que ésta última no garantiza la inactivación o la destrucción de *E. coli* O157:H7. Si bien la Food and Drugs Administration (FDA) ha recomendado temperaturas internas mínimas de 86.1°C para el adecuado cocimiento de las hamburguesas, algunos autores consideran suficiente un cocimiento final de 70°C durante 15 segundos. (8, 11)

agente etiológico podría representar un factor que apoye el proceso infeccioso. (59)

IV. PREVENCIÓN y TRATAMIENTO

i. Medidas higiénicas de prevención

La disminución en la transmisión primaria de ECEH requiere que el individuo común conozca los riesgos asociados al consumo del agua no hervida, de la ingestión de carne mal cocida y de leche no pasteurizada. De hecho, es necesario que la carne se ingiera sólo si se ha cocido plenamente, es decir, cuando su aspecto implique una coloración gris y no rosa, ya que ésta última no garantiza la inactivación o la destrucción de *E. coli* O157:H7. Si bien la Food and Drug Administration (FDA) ha recomendado temperaturas internas mínimas de 86.1°C para el adecuado cocimiento de las hamburguesas, algunos autores consideran suficiente un cocimiento final de 70°C durante 15 segundos. (8, 11)

Evidentemente, las medidas que previenen la transmisión persona a persona incluyen buenas prácticas higiénicas en las guarderías, casas-habitación, restaurantes y hospitales, sitios en donde ocurren numerosos casos relacionados con el inapropiado manejo de los alimentos. (27)

Además, todas las frutas y leguminosas que se consumen crudas deben ser desinfectadas, para que puedan consumirse sin riesgo de infección. (27)

ii. Prevención relacionada con la elaboración y aplicación de vacunas

Hasta el momento actual no se han diseñado vacunas eficaces que protejan contra ECEH. No obstante, un considerable número de productos experimentales se encuentra bajo investigación, aún cuando uno de los grandes obstáculos radica en la carencia de

modelos animales apropiados en los que la inoculación oral del microorganismo conduzca a la reproducibilidad del HUS. (59)

Desde luego, es muy probable que el antígeno vacunal más adecuado para prevenir dicha enfermedad sea la Stx; en este sentido, los toxoides correspondientes, inoculados por vía parenteral, han mostrado efectos protectores en conejos y cerdos. (59)

Por otra parte, ciertas cepas atenuadas de *V. cholerae* y *Salmonella typhimurium* han sido transformadas en productoras de Stx2 y se han administrado con parcial éxito en conejos. (59)

Paralelamente, el empleo de "intimina" también se encuentra en estudio, aplicándola como constituyente de cepas atenuadas de *V. cholerae*, vehículos a los que previamente se ha clonado el gen *eae* correspondiente. (59)

Otra prometedora vacuna específica contra EHEC O157:H7 se ha elaborado con base en el polisacárido O157, el cual se ha conjugado a proteínas acarreadoras. (59)

De acuerdo con lo anterior, los trabajos tendientes a desarrollar una vacuna eficaz aún se encuentran en proceso, si bien los investigadores ya tienen muy claro que, desde el punto de vista teórico, el inmunógeno ideal sería aquél que indujera inmunidad sistémica contra la Stx e inmunidad local contra la intimina y otros factores de colonización. (59)

iii. Tratamiento

Los regímenes terapéuticos asociado a los padecimientos ocasionados por ECEH aparentan ser tan prolongados y costosos como de dudosa efectividad; de hecho, aunque el microorganismo parece ser sensible a una importante variedad de antibióticos, ni

siquiera existen pruebas de que éstos acorten la duración de los cuadros. (6, 79)

Con base en un estudio retrospectivo, Proulx y cols reportaron una menor incidencia de HUS en los pacientes que habían recibido terapia antimicrobiana en forma oportuna; de la misma manera, un trabajo japonés efectuado en 1996 durante un brote epidémico, sugirió que el tratamiento temprano con fosfomicina había disminuido el riesgo de adquirir HUS. (59)

Sin embargo, continúa pensándose que, en realidad, aún no se cuenta con un tratamiento específico para combatir las infecciones causadas por *E. coli* O157:H7, salvo la terapia de soporte (restitución del agua y los electrolitos perdidos) y el control de las complicaciones tales como la anemia y el daño renal. (59)

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Es decir, buena parte de los autores aún establece que los agentes antimicrobianos no modifican el curso de la enfermedad y, por el contrario, que su uso representa un factor de riesgo para el desarrollo de la patología y se asocia al incremento de la mortalidad. De hecho, se ha publicado que los antibióticos pueden empeorar el curso clínico de la enfermedad a través de dos mecanismos:

- La eliminación de la flora intestinal que conduciría a una sobrepoblación por parte del agente causal, y
- La destrucción o el daño subletal de los microorganismos infectantes, con la subsecuente liberación de las toxinas Stx.

(41)

Al margen de lo anterior, se ha demostrado que la mayor parte de los aislamientos de *E. coli* O157:H7 son uniformemente susceptibles *in vitro* a la ampicilina, carbenicilina, cefalotina, cloranfenicol,

gentamicina, kanamicina, ácido nalidíxico, norfloxacin, sulfisoxazol, tetraciclina, ticarcilina, tobramicina, trimetoprim y trimetoprim-sulfametoxazol (TMP-SZL). Por el contrario, las mismas cepas han resultado resistentes a eritromicina, metronidazol, vancomicina y, ocasionalmente, a tetraciclina. (35, 41)

Paralelamente, se ha comprobado que los pacientes tratados con TMP-SZL experimentan largos períodos de diarrea común o sanguinolenta, facilitando que sobrevenga el HUS. Asimismo, se ha revelado que el TMP-SZL y la polimixina B incrementan *in vitro* la concentración de las Stx. (59)

Cabe agregar que los agentes antidiarreicos también representan un factor de riesgo en la evolución de las diarreas hacia HUS, ya que promueven una mayor absorción de las toxinas.

El tratamiento de soporte de la enfermedad renal causada por EHEC llega a incluir diálisis, hemofiltración, transfusión de paquete eritrocitario e infusión de plaquetas, aunque los casos de mayor gravedad suelen requerir de trasplante renal. Una nueva medida, la cual aún se encuentra bajo investigación, reside en el uso del producto conocido como Sinsorb-Pk; éste consiste en un análogo sintético del Gb₃ -el receptor de la Stx- acoplado a tierra de diatomeas, que se administra oralmente a los pacientes que presentan diarrea sanguinolenta para que absorba a la Stx y ésta no llegue al torrente circulatorio. (59)

En cuanto al tratamiento de la PTT, suelen emplearse -como soporte- las transfusiones de plasma y/o sangre, exsanguinotransfusiones o plasmaféresis con resultados alentadores. Tanto la plasmaféresis como la administración

intravenosa de plasma deben realizarse de manera intermitente y se consideran como las medidas requeridas con mayor frecuencia.

(59)

V. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

Por lo general, la detección de ECEH en el laboratorio requiere del aislamiento del microorganismo a partir de las evacuaciones del enfermo, principalmente cuando se trata de deposiciones sanguinolentas provenientes de niños o adultos. (46, 50, 62)

Aunque el microorganismo desarrolla sin problemas en cualquiera de los medios sólidos empleados en los coprocultivos, el hecho de que sea lactosa-positiva impide distinguirlo de otras cepas de *E. coli*; en tal sentido, debe contemplarse el empleo del medio SMAC, correspondiente a un agar MacConkey en el que se ha sustituido la

lactosa por D-sorbitol ya que, a diferencia de otras cepas de la misma especie, ECEH no fermenta dicho carbohidrato. (1, 53, 64)

Es decir, la elección de colonias sorbitol-negativo ayuda a simplificar la detección y permite ahorrar importantes cantidades de los sueros hiperinmunes correspondientes.

Cabe mencionar que diversos autores recomiendan adicionar cefixime (C), telurito (T) y ramnosa (R) al SMAC, ya que los dos primeros incrementan la selectividad del medio mientras que, la tercera, facilita aún más la diferenciación de ECEH, la cual tampoco fermenta ramnosa. No obstante, la incorporación de dichos antibacterianos (CT) puede resultar inconveniente, ya que se ha demostrado que ambos inhiben el crecimiento de numerosas cepas O157:NM. (37, 62)

Otro medio sólido propuesto es el elaborado con 4-metilumbeliferil- β -D-glucuronido (MUG), ya que la mayoría de las cepas O157:H7 y O157:NM que sintetizan Stx son MUG-negativas, lo que las diferencia de otras clonas de *E. coli*. Sin embargo, esta prueba presenta la desventaja de que, entre las cepas MUG-positiva se cuenta a las ECEH no-O157. (16)

De acuerdo con lo antes mencionado, lo más recomendable sería sembrar los especímenes en una placa de SMAC y, adicionalmente, en una o dos placas más, de CT-SMAC, R-SMAC o agar-MUG, si bien es preciso tomar en cuenta que el tiempo y los costos pueden aumentar significativamente -dependiendo de la cantidad de placas empleadas-, en virtud del número de colonias que se someterán a las pruebas ulteriores. (21,22)

Una vez que se han reconocido las colonias sospechosas sorbitol-negativas, éstas se propagan en un medio común (agar tripticase

soya o equivalente), a fin de contar con el suficiente crecimiento de cada una y realizar diversas reacciones inmunológicas que confirmen o descarten la presencia de alguno de los serotipos de ECEH (consultar la tabla X). (50, 62, 63)

Dichas pruebas inmunoquímicas incluyen más frecuentemente el empleo de anticuerpos adsorbidos a partículas de látex, los principales de los cuales están dirigidos contra el antígeno O157 y, al existir homología, provocan la aglutinación de los microorganismos. Empero, es conveniente considerar que ciertos trabajos han mostrado que algunos microorganismos no fermentadores de sorbitol llegan a reaccionar inespecíficamente con el látex, por lo que las colonias que hayan resultado positivas deben ser probadas posteriormente con partículas libres de anticuerpos. (24, 28, 33)

Alternativamente, las colonias sorbitol-negativas pueden sembrarse en agar sangre de borrego suplementado con calcio (SBA-Ca o WSBA-Ca -este último por *washed sheep blood agar*-), el cual diferencia a las cepas enterohemolíticas -como la gran mayoría de las cepas O157 y el 60 a 80 % de las ECEH no-O157- de otras *E. coli* que sólo sintetizan una α -hemolisina. (16, 50)

A tal respecto, sólo estas últimas desarrollan en 3 a 4 h en SBA-Ca, tiempo en el que debe marcárseles, mientras las productoras de enterohemolisina sólo se manifiestan macroscópicamente hasta las 18-24 h de incubación; evidentemente, la relativa subjetividad de esta prueba obliga a confirmar los resultados mediante reacciones de aglutinación en látex. (50)

De cualquier manera, el CDC norteamericano recomienda enviar tanto los aislamientos O157 como las supuestas cepas enterohemolisina-positiva a los laboratorios de referencia, en donde se confirmaría el hallazgo pero, además, se investigaría el serotipo H y la posibilidad de que las cepas implicadas sintetizen Stx.

Tabla X. Serotipos de ECEH.(57,63)

ECEH o STEC			
O1:NM	O45:NM	O111:H2	O126:NM
O1:H1	O45:H2	O111:H7	O126:H8
O1:H7	O48:H21	O111:H8	O126:H21
O2:H1	O50:NM	O111:H30	O128:NM
O2:H5	O50:H7	O111:H34	O128:H2
O2:H6	O52:H25	O111:HNT	O128:H8
O2:H7	O55:NM	O112:H21	O128:H12
O4:NM	O55:H7	O113:H2	O128:H25
O4:H10	O55:H10	O113:H7	O132:NM
O5:NM	O73:H34	O113:H21	O133:H53
O5:H16	O75:H5	O113:H53	O141:NM
O6:NM	O82:H8	O114:H4	O145:NM
O6:H1	O84:H2	O114:H48	O145:H25
O6:H28	O85:NM	O115:H10	O146:NM
O18:NM	O86:H10	O115:H18	O146:H21
O18:H7	O88:NM	O117:H4	O153:H25
O22:H8	O91:NM	O118:H12	O157:NM
O22:H16	O91:H14	O118:H30	O157:H7
O23:H7	O91:H21	O119:H5	O163:H19
O23:H16	O100:H32	O119:H6	O165:NM
O25:NM	O101:H19	O119:H5	O165:H10
O26:NM	O103:H2	O119:H6	O165:H19
O26:H2	O103:H6	O120:H19	O165:H25
O26:H8	O104:NM	O121:NM	O166:H12
O26:H11	O104:H21	O121:H8	O166:H15
O26:H32	O105:H18	O121:H19	OX3:H21
O38:H21	O110:H19	O125:NM	ONT:NM
O39:H4	O111:NM	O125:H8	ONT:H1

Tabla X-1. Serotipos de ECET, ECEP y ECEI. (57, 63)

ECET	ECET	ECEP	ECEP	ECEI
O6:NM	O85:H7	O26:NM	O114:NM	O28:NM
O6:H16	O114:H21	O26:H11	O114:H2	O29:NM
O8:NM	O115:H21	O55:NM	O119:H6	O112:NM
O8:H9	O126:H9	O55:H6	O125:H21	O115:NM
O11:H27	O128:H12	O55:H7	O126:H27	O124:NM
O15:H11	O128:H21	O86:NM	O127:NM	O124:H7
O20:NM	O128:H27	O86:H2	O127:H6	O124:H30
O25:NM	O148:H28	O86:H34	O127:H9	O135:NM
O25:H42	O149:H4	O111:NM	O128:H2	O136:NM
O27:NM	O153:H45	O111:H2	O142:H6	O143:NM
O27:H7	O159:NM	O111:H12	O158:H23	O144:NM
O27:H20	O159:H4	O111:H21		O152:NM
O49:NM	O159:H20			O164:NM
O63:H12	O166:H27			O167:NM
O78:H11	O167:H5			
O78:H12	O169:H41			

La necesidad de trasladar a los microorganismos identificados como ECEH a los laboratorios de referencia tiene que ver con el tiempo, costos y experiencia del personal, así como con fines específicamente epidemiológicos.

Por lo que respecta a la determinación del antígeno H, los sueros se distribuyen comercialmente, pero se ha comprobado que su expresión requiere de diversos subcultivos de la cepa y, por lo tanto, de numerosas pruebas y del empleo de grandes cantidades de suero, antes de clasificar al aislamiento como NM. (3, 7, 8)

Así mismo, la comprobación de la síntesis de Stx se basa en pruebas biológicas, inmunológicas y moleculares, incluida la técnica de PCR (reacción en cadena de la polimerasa), lo cual representa la necesidad de equipo especializado, animales de laboratorio y grandes cantidades de material y reactivos. (16, 37, 50, 53)

Es importante destacar que el laboratorio clínico también puede intentar la búsqueda de antígenos O157 y/o de Stx, directamente en las evacuaciones del paciente, merced a la distribución de algunos equipos (kits) comerciales. En tal contexto, destacan: a) el de Kirkegaard & Perry Laboratories Inc., así como el inmunoensayo de LMD Laboratories; ambos elaboran sueros anti-O157, aunque el primero de ellos los produce marcados con fluoresceína; y b) el de Meridian Diagnostics, Inc., al cual se conoce como Premier ECEH; este último se basa en un ensayo inmunoenzimático dirigido hacia la detección de Stx, a partir de evacuaciones del enfermo o de cultivos líquidos del agente causal, aunque los anticuerpos involucrados no reaccionan con la Stx2e. (1, 50, 53, 62, 80)

Sin embargo, es preciso puntualizar que las empresas comerciales productoras de los mencionados equipos recomiendan realizar cultivos en SMAC para confirmar los resultados, debido a la posibilidad de que se obtengan falsos negativos o positivos.

CONCLUSIONES

En relación con la patología implicada:

- ECEH se transmite de persona a persona (por vía oral-fecal) o por ingestión de agua y alimentos contaminados, pudiéndose aislar a partir de agua contaminada, carne de puerco, ganado vacuno, borregos, caballos, perros, carneros, venados, pollos, mariscos, leche bronca, lechuga, rábanos, jitomates, alfalfa, mayonesa, jugo de manzana no pasteurizado y salami fermentado.
- Previo período de incubación de 3 a 8 días, las infecciones intestinales por ECEH generalmente se caracterizan por dolor y calambres abdominales, vómito, fiebre de corta duración y una diarrea que suele evolucionar hasta tornarse totalmente sanguinolenta; en ocasiones, el cuadro llega a prolongarse hasta

por 4 a 10 días, pudiendo desencadenar la aparición de alteraciones extraintestinales asociadas al HUS y a la PTT, principalmente cuando se trata de pacientes pediátricos.

- Una vez que ECEH se establece en el intestino, se adhiere a las células epiteliales colónicas y se multiplica localmente, dando lugar a las clásicas lesiones A/E, estudiadas más extensamente en ECEP. De hecho, dichas lesiones son responsables del síndrome diarreico, mientras que la Stx origina la diarrea sanguinolenta.
- La HC puede cursar como enfermedad única o fungir como factor desencadenante del HUS y se caracteriza por dolor abdominal severo en el cuadrante inferior derecho, náuseas, vómito, escalofríos, fiebre y diarrea sanguinolenta.
- El HUS aparece abruptamente 5 a 10 días después de haber iniciado la diarrea y sus síntomas incluyen manifestaciones

gastrointestinales, si bien sus tres signos más destacados son anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia y daño renal agudo.

- El serotipo O157:H7 es el de mayor importancia clínica, ya que provoca diarrea no sanguinolenta y la mayoría de los casos de HC, HUS y PTT. Sin embargo, las cepas Stx⁺ no-O157 también participan como agentes etiológicos de las mencionadas patologías, aunque su incidencia es notablemente menor.
- Las principales medidas de prevención incluyen la conveniencia de hervir el agua y la leche, así como la de cocer suficientemente los cárnicos y la de desinfectar las frutas y leguminosas, para evitar la transmisión persona a persona dentro de las guarderías, casas-habitación, restaurantes y hospitales.
-

- Los regímenes terapéuticos aplicados actualmente son de dudosa efectividad; en realidad, sólo existe un consenso generalizado respecto a las clásicas medidas de soporte (restitución del agua y los electrolitos perdidos) y sobre la importancia de controlar la anemia y el daño renal relacionado con el HUS, mediante diálisis, hemofiltración, transfusión de paquete eritrocitario e infusión de plaquetas y, en los casos de mayor gravedad, a través de trasplante renal.
- Dado que los agentes antimicrobianos parecen potenciar el riesgo de que progrese la patología, una medida terapéutica futura podrían consistir en la administración oral de Gb₃ - molécula receptora de la Stx- acoplada a tierra de diatomeas, cuya función sería la de absorber a la Stx para evitar que ésta alcance el torrente circulatorio.

Por lo que se refiere a factores de virulencia de *E. coli* O157:H7:

- La toxina Stx constituye el principal factor de patogenidad de ECEH y presenta la clásica estructura A-B: la subunidad A es escindida proteolíticamente, produciendo los fragmentos A1 y A2, de los cuales el primero posee la actividad tóxica (inhibe la síntesis proteica) y, el segundo, es responsable de la unión de la subunidad A a la subunidad B; previamente, ésta se fija al receptor Gb3, presente en numerosas células eucariotes.
- La familia de toxinas Stx se encuentra codificada por el bacteriófago Stx ϕ y contiene 2 miembros principales que no cruzan inmunológicamente, denominados Stx1 y Stx2; este último es aún más virulento que el primero y la misma cepa puede sintetizar uno de ellos o ambos.

- Al ingresar al torrente circulatorio, la Stx origina lesiones endoteliales que promueven el estrechamiento de la luz de los capilares y la oclusión de los vasos glomerulares -a través de la acumulación de plaquetas y fibrina-; de esta manera, ocurren la reducción en el grado de filtración glomerular (ocurriendo la falla renal), la fragmentación de los eritrocitos, la aparición del TNF- α y, consecuentemente, la trombosis, la vasoconstricción y, por ende, la microangiopatía.
- El pO157 se encuentra presente tanto en la mayoría de las cepas O157:H7 como en numerosos serotipos no-O157 Stx⁺ y codifica para la síntesis de la enterohemolisina, de la proteasa EspP y de una catalasa-peroxidasa.

- La enterohemolisina genera la lisis de los eritrocitos, a fin de que estos liberen los grupos heme de la hemoglobina y, adicionalmente, induce la formación de anticuerpos séricos anti-enterohemolisina en los enfermos de HUS.
- La enterotoxina EAST1 es producida por ECEH y ECEA y, al parecer, su papel resulta trascendental en los casos de diarrea no sanguinolenta.
- La intimina de *E. coli* O157:H7 es fundamental para que ocurra la lesión A/E en los enterocitos, fungiendo como soporte de los filamentos de actina. Por su parte, el LPS de las cepas O157 potencia la citotoxicidad de la Stx sobre las células endoteliales de los vasos humanos.

Con respecto al diagnóstico de laboratorio:

- Aunque algunos equipos comerciales permiten intentar la detección del agente causal en las muestras clínicas, el aislamiento de colonias sorbitol-negativo en el medio SMAC continúa representando la mejor opción para los laboratorios promedio, merced a su relativo bajo costo y a que, secuencialmente, confiere mayor confiabilidad y economía a la aplicación de técnicas inmunológicas y moleculares.
- Las pruebas inmunológicas de mayor empleo son la de aglutinación en látex y los ensayos inmunoenzimáticos, las cuales permiten poner de manifiesto a los antígenos O y H, así como a la Stx. No obstante, es preciso considerar que algunas otras bacterias sorbitol-negativo pueden reaccionar inespecíficamente con las partículas de látex.
- Es importante tomar en cuenta que algunos brotes epidémicos han sido originados por otros serotipos Stx⁺ de *E. coli*, los más

destacados de los cuales -de acuerdo con sus considerables frecuencias- son el O26:H11, O103:H2, O111:NM y O113:H21. Por tales motivos, también empiezan a aparecer equipos comerciales destinados a detectar a estos microorganismos en el laboratorio clínico.

BIBLIOGRAFIA

1. Abbott SL: Laboratory aspects of non-O157 toxigenic *E. coli*, Clin Microbiol Newl, 1997; 19: 105-108.
2. Acheson DWK, Reidl J, Zhang X, Keusch GT, Mekalanos JJ and Waldor MK: *In vivo* transduction with Shiga toxin 1-encoding phage, Infect Immun, 1998; 66: 4496-4498.
3. Acheson DWK, and Wolf LE.: *Escherichia coli* and the Hemolytic Uremic Syndrome, New Engl J Med, 1997; 336 (7): 515.
4. Ackers M-L, Mahon BE, Leahy E, Goode B, Damrow T, Hayes PS, Bibb WF, Rice DH, Barrett TJ, Hutwagner L, Griffin PM, and Slutsker L: An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with leaf lettuce consumption, J Infect Dis, 1998; 177: 1588-1593.
5. Adu-Bobie J, Frankel G, Bain C, Goncalvez AG Travulsi L, Douce G, Knutton S and Dougan G: Detection of intimins α , β , γ and δ . Four intimin derivatives expressed by attaching and effacing microbial pathogens, J Clin Microbiol, 1998; 36: 662-668.
6. Allerberger F, Rossboth D, Dierich MP, Aleksic S, Schmidt H and Karch H: Prevalence and clinical manifestations of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in Australian children, Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 1996; 15: 545-550.
7. Banatvala N, DeBeukelaer MM, Griffin PM, Barrett TJ, Greene KD, Green JH and Wells JG: Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* O111 and associated hemolytic-uremic syndrome: a family outbreak, Pediatr Infect Dis, 1996; 15: 1008-1011.

8. Banatvala N, Magnano AR, Cartter ML, Barrett TJ, Bibb WF, Vasile LL, Mshar P, Lambert-Fair MA, Green JH, Bean NH, and Tauxe RV: Meat grinders and molecular epidemiology: two supermarket outbreaks of *Escherichia coli* O157:H7 infection, *J Infect Dis*, 1996; 173: 480-483.
9. Barret TJ, Kaper JB, Jerse AE and Wachmuth IK: Virulence factors Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* isolated from humans and cattle, *J Infect Dis*, 1992; 165: 979-980.
10. Bauer ME and Welch RA: Characterization of an RTX toxin from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7, *Infect Immun*, 1996; 64:167-175.
11. Bell BP, Goldoft M, Griffin PM, Davis MA, Gordon DC, Taarr PI, Batleson CA, Lewis JH, Barret TJ, Wells JG, Baron R, Kobayashi J: A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 - associated bloody diarrhea and hemolytic uremic syndrome from hamburgers, *J Appl Microbiol Am*, 1994; 272: 1349-1353.
12. Belongia EA, Osterholm MT, Soler JT, Ammend DA, Braun JE and MacDonald KL: Transmission of *Escherichia coli* O157:H7 infection in Minnesota child day-care facilities, *JAMA*, 1993; 269: 883-888.
13. Bettelheim KA: Identification of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* by means of their production of enterohaemolysin, *J Appl Bacteriol*, 1995; 79: 178-180.
14. Beutin L, Montenegro MA, Orskov F, Proada J, Zimmerman S and Stephan R: Close association of verocytotoxin (Shiga-like toxin) production with enterohemolysin production in strains of *Escherichia coli*, *J Clin Microbiol*, 1989; 27: 2559-2564.

5. Beutin L, Zimmerman S and 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*, 1996; 34: 2812-2814.
6. Bitzan M, Ludwig K, Klemm M, König H, Buren J and Müller-Wiefel DE: The role of *Escherichia coli* O157 infections in the classical (enteropathic) haemolytic uraemic syndrome: results of a Central European multicentre study, *Epidemiol Infect*, 1993; 110: 183-196.
7. Blattner FR, Plunkett GI, Perna NT, Shao Y, Gregor J, Mayhew GF, Mau B, Davis NW, Kirkpatrick HA, Rose D and Goeden M: Comparative genome sequencing of *E. coli* O157:H7 versus *E. coli* K-12, *Microb Comp Genomics*, 1997; 2: 174.
8. Brunder W, Schmidt H and Karch H: KatP, a novel catalase-peroxidase encoded by the large plasmid of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7, *Microbiology*, 1996; 142: 3305-3315.
9. Brunder W, Schmidt H and Karch H: EspP, a novel extracellular serine protease of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 cleaves human coagulation factor V, *Mol Microbiol*, 1997; 24: 767-778.
20. Borczyk AA, Harnett N, Lombos M and Lior H: False-positive identification of *Escherichia coli* O157 by commercial latex agglutination tests, *Lancet*, 1990; 336: 946-947.

21. Boyce TG, Pemberton AG, Wells JG and Griffin PM: Screening for *Escherichia coli* O157:H7: a nationwide survey of clinical laboratories, *J Clin Microbiol*, 1995; 33: 3275-3277.
22. Calderwood SG, Acheson DWK, Keusch GT, Barrett PM, Griffin M, Strockbine NA, Swaminathan B, Kaper JB, Levine MM, Kaplan BS, Karch H, O'Brien AD, Obrig TG, Takeda Y, Tarr PI and Wachsmuth IK: Proposed new nomenclature for SLT (VT) family, *ASM News*, 1996; 62: 118-119.
23. Chapman PA and Siddons CA: A comparison of immunomagnetic separation and direct culture for the isolation of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 from cases of bloody diarrhoea, non-bloody diarrhoea and asymptomatic contacts, *J Med Microbiol*, 1996; 44: 267-271.
24. Chart H: Are all infections with *Escherichia coli* O157 associated with cattle?, *Lancet*, 1998; 352:1005.
25. Cimolai N, Basalyga S, Mah DG, Morrison BJ, Carter JE, A continuing assessment of risk factors for the development of *Escherichia coli* O157:H7 - associated hemolytic uremic syndrome, *Clin Nephrol*, 1994; 42 (2): 85-89.
26. Coia JE: Clinical, microbiological and epidemiological aspects of *Escherichia coli* O157 infection, *FEMS Immunol Med Microbiol*, 1998; 20: 1-9.
27. Cubbon MD, Coia JE, Hanson MF and Thomson-Carter FM: A comparison of immunomagnetic separation, direct culture and polymerase chain reaction for the detection of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in human faeces, *J, Med Microbiol*, 1996; 44: 219-222.

8. Deibel C, Krämer S, Chakravorty T and Ebel F: EspE, a novel secreted protein of attaching and effacing bacteria, is directly translocated into infected host cells where it appears as a tyrosine-phosphorylated 90 kDa protein, *Mol Microbiol*, 1998;28: 463-474.
9. Djafari S, Ebel F, Deibel C, Krämer S, Hudel M and Chakravorty T: Characterization of an exported protease from Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, *Mol Microbiol*, 1998; 25:771-784.
10. Sonnenberg MS and Kaper JP: Enteropathogenic *Escherichia coli*, *Infect Immun*, 1992;60(10): 3953 - 3961.
11. Sonnenberg MS, Tacket CO, Losonsky G, Frankel G, Nataro JP, Dougan G, and Levine MM: Effect of prior experimental human enteropathogenic *Escherichia coli* infection illness following homologous and heterologous rechallenge, *Infect Immun*, 1998;66(1): 52-58.
12. Dylla BL, Vetter EA, Hughes JG and Cockerill III FR: Evaluation of an immunoassay for direct detection of *Escherichia coli* O157 in stool specimens, *J Clin Microbiol*, 1995; 33: 222-224.
13. Dytoc M, Soni R, Cockerill F, De Azavedo J, Louie M, Brunton J, Sherman P.: Multiple determinants of verotoxing-producing *Escherichia coli* O157:H7 attachment- effacement, *Infect Immun*, 1993; 61(8): 3382-3391.
14. Farina C, Goglio A, Conedera G, Minelli F and Capriolo A: Antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* O157 and other enterohemorrhagic *Escherichia coli* isolated in Italy, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 1996; 15: 351-353.

35. Feng P, Lampel KA, Karch H and Whittam TS: Genotypic and phenotypic changes in the emergence of *Escherichia coli* O157:H7, *J Infect Dis*, 1998; 177-1750-1753.
36. Fields PI, Blom K, Hughes HJ, Hesel LO, Feng P and Swaminathan B: Molecular characterization of the gene encoding H antigen in *Escherichia coli* and development of a PCR-restriction fragment length polymorphism test for identification of *E. coli* O157:H7 and O157:NM, *J Clin Microbiol*, 1997; 35: 1066-1070.
37. Goosney, D.L., Celli J, Kenny B and Finlay BB: Enteropathogenic *Escherichia coli* inhibits phagocytosis, *Infect Immun*, 1999; 67: 490-495.
38. Griffin PM, Olmstead LC, and Petras RE.: *Escherichia coli* O157:H7 - associated colitis, *Gastroenterology*, 1990; 99: 142-149.
39. Griffin PM and 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.
40. Harmann C, Karch H, Frosch M and Schmidt H: A 3.3-kb plasmid of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 is closely related to core region of the *Salmonella typhimurium* antibiotic resistance plasmid NTP16, *Plasmid*, 1998; 39: 134-140.
41. Hofinger CH, Karch H and Schmidt H: Structure and function of plasmid pCold157 of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 and its distribution among strains from patients with diarrhea and hemolytic-uremic syndrome, *J Clin Microbiol*, 1998; 36: 24-29.

2. Ismaili A, Philpott Djdytoc MT and Sherman PM: Signal transduction responses following adhesion of verocytotoxin-producing *Escherichia coli*, *Infect Immun*, 1995; 36: 24-29.
3. Itoh Y, Sugita-Konishi Y, Kasuga F, Iwaki M, Hara-Kudo Y, Saito N, Noguchi Y, Konuma H and Kumagai S.: Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 present in radis sprouts, *Appl Env Microbiol*, 1998; 64: 1532- 1535.
4. Jarvis KG, Kaper JB: Secretion of extracellular proteins by enterohemorrhagic *Escherichia coli* via a putative type III secretion system, *Infect Immun*, 1996; 64: 4826- 4829.
5. Johnson RP, Clarkje RC, Wilson JB, Read SC, Rahn K, Renwick SA, Sandhu KA, AlvesD, Karmali MA, Lios H, McEwen SA, Spika JS and Gyles CL: Growing concerns and recent outbreaks involving no - O157:H7 serotypes of verotoxigenic *Escherichia coli* , *J Food Prot*, 1996;59:1112-1122.
6. Kaper JB, Elliott S, Sperandio V, Perna NT, Mayhew GF and Blattner FR: Attaching and effacing intestinal histopathology and the *locus* of enterocyte effacement, in Kaper JB and O' Brien AD (ed), *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga-toxin producing *E. coli* strains, American Society for Microbiology, Washington, DC.
7. Kaper JB, Gansheroff WR, Wachtel WR and O' Brien AD: Intimin-mediated adherence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and attaching-and-effacing pathogens, in Kaper JB and O' Brien AD (ed), *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga-toxin producing *E. coli* strains, American Society for Microbiology, Washington, DC.
8. Kaper JB and O' Brien AD (ed), *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga-toxin producing *E. coli* strains, American Society for Microbiology, Washington, DC.

49. Karch H, Janetzki-Mittman C, Aleksic S and Datz M: Isolation of *Escherichia coli* O157 strains from patients with hemolytic-uremic syndrome by using immunomagnetic separation, DNA-based methods, and direct culture, 1996; *J Clin Microbiol*, 1996; 34: 516-519.
50. Karch H, Meyer T, Rüssmann H and Heesemann J: Frequent loss of Shiga-like toxin genes in clinical isolates of *Escherichia coli* upon subcultivation, *Infect Immun*, 1992; 60: 3464-3467.
51. Karch H, Rüssmann H, Schmidt H, Schwarzkopf A and Heesemann J: Long-term shedding and clonal turnover of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 in diarrheal disease, *J Clin Microbiol*, 1995; 33: 1602-1605.
52. Kehl KS, Havens P, Behnke CE and Acheson DWK: Evaluation of the Premier EHEC assay for detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, *J Clin Microbiol*, 1997; 35: 2051-2054.
53. Levine MM, Ferreccio C, Prado V, Cayazzo M, Abrego P, Martinez J, Maggi L, Baldini MM, Martín W, Maneval D, Kay B, Guers I, Lior H, Wasserman SS and Nataro JP: Epidemiologic studies of *Escherichia coli* diarrheal infections in a low socioeconomic level peri-urban community in Santiago, Chile, *Am J Epidemiol*, 1993; 138: 849-869.
54. Levine MM, Xu J, Kaper JB, Lior H, Prado V, Tall B, Nataro J, Karch H and Wachsmuth K: A DNA probe to identify enterohemorrhagic *Escherichia coli* of O157:H7 and other serotypes that cause hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome, *J Infect Dis*, 1987; 156: 175-182.
55. Makino K, Ishii K, Yasunaga T, Hattori M, Yokoyama K, Yatsudo CH, Kubota Y, Yamaichi Y, Iida T, Yamamoto K, Honda T, Han C, Ohtsubo E, Masamatsu M, Hayashi T, Kuhara S and Shinagawa H: Complete nucleotide sequences of 93-kb and 3.3-kb plasmids of an enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 derived from Sakai outbreak, *DNA Res*, 1998; 5: 1-9.

66. McCarthy M.: *E coli* O157:H7 outbreak in USA traced to apple juice, *Lancet*, 1996; 348:1299.
67. McDaniel TK, Jarvis KG, Donnenberg MS and Kaper JB: A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995; 92: 1664-1668.
68. Nataro JP and Kaper JB: Diarrheagenic *Escherichia coli*, *Clin Microbiol Rev*, 1998; 11: 142-201.
69. Neild GH.: Haemolytic-uraemic syndrome in practice, *Lancet*, 1994; 343:398-401.
60. O'Brien AD, Tesh VL, Donohue-Rolfe A, Jackson MP, Olsnes S, Sandvig K, Lindberg AA and Keusch GT: Shiga toxin: biochemistry, genetics, mode of action, and role in pathogenesis, *Curr Top Microbiol Immunol*, 1992; 180: 65-94.
61. Park CH, Gates KM, Vandel NM and Hixon D: Isolation of Shiga-like toxin producing *Escherichia coli* (O157 and non-O157) in a community hospital, *Diagn Microbiol Infect Dis*, 1996; 26: 69-72.
62. Park CH, Hixon DL, Morrison WL and Cook CB: Rapid diagnosis of *Escherichia coli* O157:H7 directly from fecal specimens using immunofluorescence stain, *Am J Clin Pathol*, 1994; 101: 91-94.
63. Park CH, Vandel NM and Hixon DL: Rapid immunoassay for detection of *Escherichia coli* O157 directly from stool specimens, *J Clin Microbiol*, 1996; 34: 988-990.
64. Paros M, Tarr PI, Kim H, Besser TE and Hancock DD: A comparison of human and bovine *Escherichia coli* O157:H7 isolates by toxin genotype, plasmid profile, and bacteriophage lambda-restriction fragment length polymorphism profile, *J Infect Dis*, 1993; 168: 1300-1303.

65. Paton AW, Manning PA, Woodrow MC and Paton JC: Translocated intimin receptors (Tir) of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* isolates belonging to serogroups O26, O111, and O157 react with sera from patients with hemolytic-uremic syndrome and exhibit marked sequence heterogeneity, *Infect Immun*, 1998; 66: 5580-5586.
66. Paton AW and Paton JC.: Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for stx1, stx2, eaeA, enterohemorrhagic *E. coli* HlyA, rfb o111, and rfb o157, *J Clin Microbiol*, 1998; 36(2):598-602.
67. Paton AW, Ratcliff RM, Doyles RM, Seymour-Murray J, Davos D, Lanser JA and Paton JC: Molecular microbiological investigation of an outbreak of hemolytic-uremic syndrome caused by dry fermented sausage contaminated with Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli*, *J Clin Microbiol*, 1996; 34: 1622-1627.
68. Perna NT, Mayhew GF, Posfal G, Elliott S, Donnenberg MS, Kaper JB and Blattner FR: Molecular evolution of a pathogenicity island from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7, *Infect Immun*, 1998; 66: 3810-3817.
69. Pickering LK, Obrig TG and Stapleton FB.: Hemolytic Uremic Syndrome and enterohemorrhagic *Escherichia coli*, *Pediatr Infect Dis J*, 1994;13: 459-476.
70. Remuzzi G, Ruggenti P.: The Hemolytic uremic syndrome, *Kid Int*, 1998;53 suppl.66: S-54 - S57.
71. Rietra PJ, Willshaw GA, Smith HR, Field AM, Scotland SM and Rowe B: Comparison of Vero-cytotoxin-encoded phages from *Escherichia coli* of human and bovine origin, *J Gen Microbiol*, 1989; 135: 2307-2318.

2. Rode CK, Melkerson-Watson LJ, Johnson AT and Bloch CA: Type-specific contributions to chromosome size differences in *Escherichia coli*, *Infect Immun*, 1999; 67: 230-236.
3. Rondeau E and Peraldi MN: *Escherichia coli* and the Hemolytic Uremic Syndrome, *New Engl J Med*, 1996;335 (9): 660-662.
4. Rowe PC, Orrbine E, Lior H, Wells GA, Yetisir E, Clulow M, and McLaine PN: Risk of hemolytic uremic syndrome after sporadic *Escherichia coli* O157:H7 infection: Results of canadian collaborative study, *J Pediatr*, 1998; 132(5):777-781.
5. Schmidt H, Henkel B and Karch H: A gene cluster closely related to type II secretion pathway operons of gram-negative bacteria is located on a large plasmid of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains, *FEMS Microbiol Lett*, 1997; 148: 265-272.
6. Schmidt H and Karch H: Enterohemolytic phenotypes and genotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O111 strains from patients with diarrhea and hemolytic-uremic syndrome, *J Clin Microbiol*, 1996; 34: 2364-2367.
7. Schmidt H, Kernbach C and Karch H: Analysis of the EHEC *hly* operon and its location in the physical map of the large plasmid of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7, *Microbiology*, 1996; 907-914.
8. Slutsker L, Ries AA, Greene KD, Wells JG, Hutwagner L and Griffin PM: *Escherichia coli* O157:H7 diarrhea in the United States: clinical and epidemiologic features, *Ann Intern Med*, 1997; 126: 505-513.
9. Sowers EG, Wells JG and Strockbine NA: Evaluation of commercial latex reagents for identification of O157 and H7 antigens of *Escherichia coli*, *J Clin Microbiol*, 1996; 34: 1286-1289.

80. Sperandio V, Kaper JB, Bortolini MR, Neves BC, Keller R and Trabulsi LR: Characterization of the *locus* of enterocyte effacement (LEE) in different enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and Shiga-toxin producing *Escherichia coli* (STEC) serotypes, FEMS Microbiol Lett, 1998; 164: 133-139.
81. Sperandio V, Mellies J, Nguyen W and Kaper JB: Regulation by quorum sensing of genes encoding the type III secretion system in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7.
82. Su C, Brandt LJ: *Escherichia coli* O157:H7 infection in humans, Ann Int Med, 1995; 123(9): 698-714.
83. Swerdlow DL and Griffin PM: Duration of faecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 among children in day-care centers, Lancet, 1997; 349: 745-746.
84. Swerdlow DL, Woodruff BA, Brady RC, Griffin PM, Tippen S, Donnel HD, Geldreich E, Payne BJ, Meyer A, Wells JG, Greene KD, Bright M, Bean NH and Blake PA: A waterborne outbreak in Missouri of *Escherichia coli* O157:H7 associated with bloody diarrhea and death, Ann intern Med, 1992; 117: 812-819.
85. Swinbanks D: Japan shuns radishes after possible link to E coli, Nat, 1996; 382: 567.
86. Tarr PI: *Escherichia coli* O157:H7: Clinical, Diagnostic and Epidemiological aspects of human infection, clin Infect dis, 1995;20: 1-10.
87. Tilden J, Young W, McNamara A, Custer C, Boesel B, Lambert-Fair MA, Majkowski J, Vugia D, Werner SB: A new route of transmission for *Escherichia coli*: infection from dry fermented salami, 1996; 86 (8):1142-1145.

8. Warwicker p, Goodship THJ, Donne RL, Pirson Y, Nicholls A, Ward RW, Turnpenny P, Goodship JA.: Genetic studies into inherited and sporadic hemolytic uremic syndrome, *Kid Int*, 1998;53: 836-844.
9. Wieler LH, McDaniel TK, Whittam TS and Kaper JB: insertion site of the *locus* of enterocyte effacement in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* differs in relation to the clonal phylogeny of the strains, *FEMS Microbiol Lett*, 1997; 156: 49-53.
10. Willshaw GA, Scotland SM, Smith HR, Cheasty T, Thomas A, Rowe B.: Hybridization of strains of *Escherichia coli* O157:H7 with probes derived from *eaeA* gene of enteropathogenic *E. coli* and the *eae A* homolog from a verotoxin-producing strain *E. coli* O157, *J Clin Microbiol*, 1998;32 (4):897-902.