



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**PATOLOGÍA Y VIRULENCIA
ASOCIADAS A CEPAS DE
Escherichia coli PRODUCTORAS DE
TOXINA DE SHIGA (STEC)**

**TRABAJO MONOGRÁFICO DE
ACTUALIZACIÓN**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO-BIÓLOGO**

**P R E S E N T A :
GERMAIN CHIGO PASCUAL**



MÉXICO, D.F.

2013



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:	Profesor: María del Carmen Cortés Decuir
VOCAL:	Profesor: Raúl Garza Velasco
SECRETARIO:	Profesor: Abel Gutiérrez Ramos
1er. SUPLENTE:	Profesor: Alejandro Camacho Cruz
2° SUPLENTE:	Profesor: Javier Fernández Torres

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Bibliotecas de las Facultades de Química y Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México y del Sector Salud.

ASESOR DEL TEMA

QFB. Raúl Garza Velasco

SUSTENTANTE

Germain Chigo Pascual

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	4
I. GENERALIDADES	5
a) <i>E. coli</i> diarreagénicas	5
b) Importancia de STEC	8
II. PATOLOGÍA	14
a) Manifestaciones clínicas	14
b) El modelo “adherencia-borramiento-eliminación”	17
c) Patologías asociadas a STEC	19
Infección asintomática y diarrea sin sangre	20
Colitis hemorrágica (CH)	21
Síndrome Urémico Hemolítico (HUS)	24
Púrpura trombocitopénica trombótica (PTT)	28
d) Epidemiología	30
e) Serotipos no-O157:H7	36
III. FACTORES DE VIRULENCIA	39
a) Toxinas de Shiga	41
b) Enterotoxina EAST1	50
c) Enterohemolisina	51
d) Factores de adherencia intestinal	52
e) Plásmido pO157	60
f) LPS	62
g) Procuración de hierro	62
IV. PREVENCIÓN y TRATAMIENTO	64
a) Medidas higiénicas de prevención	64
b) Prevención relacionada con la elaboración y aplicación de vacunas	65
c) Tratamiento	66
V. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO	70
CONCLUSIONES	77
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80

INTRODUCCIÓN

Las cepas de *Escherichia coli* productoras de toxinas de Shiga (Stx1 y Stx2), conocidas genéricamente como STEC (por *Shiga-toxin producing Escherichia coli*), representan un importante problema de salud en numerosos países desarrollados, ya que provocan al humano padecimientos tales como colitis hemorrágica, diarrea sanguinolenta y síndrome urémico hemolítico (HUS); esta última afección resulta particularmente grave, ya que cursa con daño a los riñones, pudiendo conducir a falla renal importante, e inclusive, a la muerte, especialmente en niños y ancianos, aunque también compromete a otros grupos etarios (103).

Las toxinas de Shiga representan los principales factores de patogenicidad del agente etiológico: son liberadas desde el sitio de colonización y se difunden local y sistémicamente hasta alcanzar su “blanco” de acción; se unen a las células endoteliales de los pequeños vasos que irrigan los tejidos intestinales y renales, propiciando la activación de sus procesos de muerte celular programada (apoptosis), a través de la previa inhibición de su síntesis proteica; ésta ocurre cuando las Stx alcanzan el citoplasma y provocan la eliminación de una adenina de la unidad ribosomal 28S, con base en su actividad catalítica como glicosidasa (103).

La alta virulencia de STEC se refleja en muy bajas dosis infecciosas para el humano, las cuales fluctúan solamente entre las 50 y 700 células bacterianas, que se adquieren principalmente por ingestión de alimentos contaminados, aunque no se descartan la transmisión persona a persona ni el consumo de agua u otras bebidas (103).

La mayor fuente del microorganismo es el intestino del ganado y, consecuentemente, la carne de res mal cocida y los vegetales crudos (espinacas, lechugas, rábanos, etc.) cultivados en ranchos y granjas en los cuales existe estiércol de reses (12, 103).

Si bien no existen reportes acerca de su detección en territorio mexicano, es obvio que nuestra comunidad no está exenta de que empiece a ser afectada, puesto que ya existen reportes sobre su incidencia en diversos países sudamericanos, lo que demuestra que los latinos somos susceptibles a la infección (35, 120).

Paralelamente, la creciente comunicación y comercialización a nivel global impulsan que se compartan beneficios y perjuicios mundialmente. Así mismo, cabe señalar que existe una relación directa muy evidente entre EPEC (cuyas tasas de morbilidad son muy considerables en México) y STEC, la cual se refleja en los genes de virulencia presente

en ambas y su única diferencia significativa reside en la carencia de los genes que codifican para las Stx, provenientes de bacteriófagos que, junto con los productos alimenticios de exportación, podrían llegar a cualquier región geográfica (103).

Ante tal situación, es necesario que en México se incorporen técnicas que permitan detectar las Stx en las evacuaciones de los eventuales enfermos, entre las cuales destacan metodologías conocidas tales como los ensayos inmunoenzimáticos y la aglutinación en látex. Hasta ahora, sería imposible diagnosticar con certeza si los pacientes con falla renal que requieren diálisis están siendo afectados por este microorganismo (25).

El presente trabajo aborda las más relevantes características de las enfermedades ocasionadas por STEC y expone los factores de virulencia que hacen de este microorganismo una causa de especial expectación para los países en los que aún no se le presta la pertinente atención, dada el cuidado que se le da a otros agentes intestinales que nos aquejan, tales como ETEC, Rotavirus, *Salmonella*, *Shigella*, *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* y otros muy diversos protozoarios.

OBJETIVOS

- Describir las principales características de las enfermedades ocasionadas por STEC, con especial énfasis en la colitis hemorrágica, la diarrea sanguinolenta y el síndrome urémico hemolítico, aludiendo a los alimentos y bebidas con cuya ingestión se le relaciona con mayor frecuencia al proceso infeccioso involucrado y las medidas más utilizadas para prevenir y tratar los cuadros que tienen lugar al presentarse dichos padecimientos.
- Mencionar los más trascendentales genes y factores de virulencia implicados en la adherencia de STEC a los enterocitos y en su permanencia o sobrevivencia dentro del organismo humano, como condición para la posterior liberación de las toxinas de Shiga.
- Señalar los serotipos que pueden desencadenar los cuadros patológicos debidos a STEC, así como los datos de laboratorio que sugieren su participación en el deterioro de la salud y las metodologías más adecuadas para detectar a las toxinas de Shiga en las evacuaciones de los individuos enfermos.

I. GENERALIDADES

a) *E. coli* diarreagénicas

La especie *Escherichia coli* se considera un colonizador habitual del intestino humano, al que beneficia produciendo diversas vitaminas, entre las que destacan la K, el pantotenato, la niacina y el ácido fólico. Sin embargo, este mismo microorganismo llega a manifestarse como uno de los más frecuentes agentes causales de padecimientos, cuando por razones diversas abandona el intestino; en este sentido, es el que ocasiona más casos de septicemia e infecciones urinarias y, en nuestro medio, es el tercero en meningitis infantil (103).

Por lo que se refiere a las cepas que provocan diarrea, éstas son completamente distintas y difieren del resto en cuanto a la producción de otros factores de patogenicidad: Por ejemplo, *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) sintetiza adhesinas CFA y CS, las toxinas termolábil (TL) y termoestable (TE) y representa el agente etiológico más frecuente de diarreas acuosas de índole bacteriano entre la población infantil de los países subdesarrollados, además de ser el más destacado responsable de la “diarrea del viajero”. *E. coli* enteropatógena (EPEC) cuenta con BFP y una intimina para su especial modelo de adherencia, y 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 industrializados y llega a originar algunas

epidemias en adultos. *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) produce las proteínas IpaB, IpaC e IpaD y 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 extraordinaria capacidad para invadir intercelularmente el epitelio intestinal e inducir cuadros disenteriformes. *E. coli* enteroagregativa (EAGGEC) expresa fimbrias AAF y se asocia a diarreas persistentes hasta por 14 días en los niños que habitan en países subdesarrollados, si bien diversos brotes y estudios realizados en voluntarios humanos sugieren que también afecta a los adultos y que su distribución geográfica es mundial. *E. coli* adherente-difusa (DAEC) corresponde a un grupo heterogéneo de microorganismos y los estudios epidemiológicos efectuados hasta ahora han generado grandes controversias acerca de su verdadero significado clínico. Finalmente, *E. coli* productora de toxinas de Shiga (STEC) 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 también empieza a detectarse en algunos países latinoamericanos en vías de desarrollo (103).

Cabe subrayar que la enteropatogenicidad de *E. coli* reside principalmente en el hecho de que cada una de las seis categorías involucradas cuenta con elementos genéticos particulares que la

diferencian de las cinco restantes (103). La tabla 1 enumera los factores genéticos definidos a la fecha.

Tabla 1. Elementos genéticos que codifican para factores de virulencia en cepas de *E. coli* que causan diarrea al humano (103).

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

¹ El término “isla de patogenicidad” se refiere a una región cromosómica cuyos productos son esenciales para la virulencia 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 distinta al resto del cromosoma.

b) Importancia de STEC

En 1983, Riley, después de analizar 2 brotes epidémicos en los que la enfermedad daba lugar a dolores y calambre abdominales, acompañados por diarrea acuosa y evacuaciones especialmente sanguinolentas y una fiebre casi imperceptible, clasificó a la patología como colitis hemorrágica (HC) y la relacionó con la ingestión de hamburguesas mal cocidas, comercializadas en una cadena de restaurantes de comida rápida. Los coprocultivos practicados a los pacientes redituaron el aislamiento de una cepa de *E. coli* hasta entonces desconocida, perteneciente al serotipo O157:H7 (126).

Ese mismo año, Karmali difundió sus hallazgos sobre el casos síndrome urémico hemolítico (HUS), aludiendo a cepas de *E. coli* productoras de una potente citotoxina, detectables ambas en la materia fecal de los individuos afectados. El HUS, definido por la aparición de una tríada de signos clínicos: falla renal, trombocitopenia y anemia hemolítica, habiéndose asociado a previas diarreas sanguinolentas (72).

La preocupación mayor residía en la gravedad del daño renal y en la cantidad de infantes en los que ocurría el padecimiento, algunos de los cuales morían sin responder a los desesperados recursos terapéuticos que se practicaban (72).

De esta manera, 2 hallazgos clínico-microbiológicos, el primero basado en la detección de un raro serotipo de *E. coli* y, el segundo, fundamentado en la presencia de una citotoxina específica, condujeron al reconocimiento de un nuevo agente patógeno causante de este padecimiento renal e intestinal.

Las publicaciones de 1977 ya hablaban de una posible citotoxina que podía investigarse en filtrados de cultivos líquidos de ciertas cepas de *E. coli*. Si bien no se había logrado aislar, era claro su efecto citopático en los cultivos de células Vero (83). Por su parte, O'brien se refería extractos de ciertas cepas, que resultaban citotóxicos para las células HeLa y subrayaba que los efectos podían neutralizarse con anticuerpos dirigidos contra la toxina de Shiga (Stx), sintetizada por *Shigella dysenteriae* tipo 1; de esta manera, propuso a la comunidad científica denominar a esas exotoxinas como SLT, por *Shiga-like toxin* (107).

Posteriormente, O'brien mostró que la SLT y la toxina Vero de Konowalchuk eran en realidad una misma y que las cepas O157:H7 la producían consistentemente (105); asimismo, Johnson confirmó que dicho serotipo se había asociado a individuos con HC en Canadá y que liberaba una citotoxina que actuaba sobre células Vero (64). 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, y originaba el daño a los tejidos renal e intestinal (71).

Tal como ha ocurrido con la mayoría de los microorganismos calificados como "patógenos emergentes", aún persiste la pregunta de si STEC es realmente un nuevo agente etiológico, o bien, si su participación en las enfermedades provenía de tiempo atrás pero no se había podido detectar (103).

En respuesta, 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, pero sólo encontraron un aislamiento de dicho microorganismo (126). Algo similar ocurrió de 1978 a 1982 en el Reino Unido y en Canadá (36, 64).

Esas importantes observaciones permitieron comprobar que la actual presencia del serotipo O157:H7 ha obedecido a la proliferación y diseminación de una "nueva clona" de *E. coli*, que ha adquirido genes a los cuales debe su peculiar virulencia y sorprendente distribución geográfica (103). Cabe señalar, que el HUS ya era una entidad clínica conocida anteriormente, pues se había descrito inicialmente en 1955, aunque su origen bacteriano pudo establecerse hasta que se detectaron

cepas de *Shigella dysenteriae* tipo 1 productoras de Stx (70). Finalmente, en diversos brotes epidémicos, los coprocultivos no revelaron la presencia de *Shigella*, sino la de *E. coli*, lo cual inicialmente hizo dudar en su participación etiológica, habida cuenta del papel benéfico que se le reconoce como productora de vitaminas K, B3, B5 y B7 en el intestino (103).

La incertidumbre empezó a desaparecer en 1968, cuando Kibel y Barnard sugirieron que una cepa mutante de *E. coli*, infectada por un bacteriófago, podría ser la responsable de la enfermedad en África (80). En la década de los 80's, se demostró que la Stx era codificada por un bacteriófago de *E. coli* y que, como resultado de ello, numerosos serotipos de esta especie podían sintetizarla y, por lo tanto, ocasionar los padecimientos correspondientes (108, 130, 138).

Las cepas O157:H7 se encuentran estrechamente relacionadas con *E. coli* enteropatógena (EPEC) 055:H7 la cual, sin embargo, es Stx-negativa; EPEC provoca muy numerosos casos de diarrea infantil en todo el mundo, su mecanismo de acción difiere en lo general del mostrado por STEC; aunque es muy claro que ambas comparten su forma de adherencia al intestino y otros interesantes factores de patogenicidad (103).

En la literatura se discute si STEC es producto del incremento de genes de virulencia en EPEC, pero algunos autores afirman que las cepas de *E. coli* productoras Stx-positivas de otros serotipos podían haber estado presentes durante décadas, pero solo se detectaron en los 80's, al reconocerse la etiología y virulencia de serotipo O157:H7 (103).

Desafortunadamente para el estudio del agente causal, los diversos trabajos realizados en un tiempo relativamente corto dieron lugar a nomenclaturas diferentes, no sólo para una misma citotoxina: Stx, SLT, toxina Vero, etc. Sino, inclusive, para el microorganismo: VTEC (de *verotoxigenic E. coli*), STEC (de *Shiga toxin producing E. coli*), SLTEC (de *Shiga-like toxin producing E. coli*), etc. (103).

Entonces, 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 pueden estar ausentes otros factores de virulencia. Adicionalmente, el también famoso término "*E. coli* enterohemorrágica" (EHEC) 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 (85, 86). En ese sentido, EHEC correspondería a subgrupo de STEC con el que se pretende delimitar a las cepas de

interés clínico, lo que suele generar confusiones para quien inicia el estudio de estas cepas de *E. coli* (103).

II. PATOLOGÍA

a) Manifestaciones clínicas

En 1993, el personal médico y los laboratorios clínicos de Seattle hubieron de enfrentar una inusual cantidad de casos en los cuales pacientes infantiles eran infectados por fallas renales agudas, emergencia que se presentó casi al mismo tiempo en Nevada, Idaho y California, como resultado del consumo de hamburguesas en la misma firma de comida rápida. El problema se originó debido a que un mismo proveedor proporcionaba la carne a esa cadena comercial y ésta no se cocinaba adecuadamente, lo que permitía la sobrevivencia del microorganismo. Brotes epidémicos como el mencionado han demostrado que STEC provoca un amplio espectro de signos y síntomas 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 (115).

Generalmente, pocas bacterias patógenas están capacitadas para provocar todo el rango de síndromes clínicos que caracterizan a las

cepas de STEC causantes de HC y HUS. De hecho, la gran importancia de este microorganismo está reflejada en la respuesta de la comunidad médica e infectológica 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 (71).

Incuestionablemente, las investigaciones clínicas más extensas han incidido en STEC 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 (103).

Desde el punto de vista histopatológico, la infección por este microorganismo incluye hemorragia y edema en la lámina propia (50); sin embargo, estos mismos signos también aparecen en el colon ascendente y transversal, originando una imagen específica en las radiografías obtenidas a partir de los enemas con bario; además, las biopsias colónicas de numerosos pacientes muestran necrosis focal e infiltración de polimorfonucleares (PMNs) (18, 126). 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 (50).

Una vez que ha atravesado el estómago, STEC 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-borramiento-eliminación”). La producción de las citotoxinas Stx promueven la inflamación de la mucosa colónica, dando como resultado los exudados purulentos y la presencia de sangre en las heces fecales (103).

El período de incubación de las diarreas fluctúa entre 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 (103).

Finalmente, los exámenes inmunocitoquímicos muestran que los anticuerpos existentes en la submucosa pertenecen, de manera primaria, a las clases IgG, IgA e IgM (103).

b) El modelo “adherencia-borramiento-eliminación”

Evidentemente, las causas de la aparición de la diarrea en los individuos afectados por STEC son multifactoriales. No obstante, destacan los cambios en la secreción de agua y electrolitos por el epitelio, el aumento de la permeabilidad de la membrana y, sobre todo, el borramiento de las microvellosidades del enterocito, lo que impide la importante función de absorción en el intestino. Sin lugar a dudas y tal como también se ha demostrado en EPEC, el signo más destacado de las patologías debidas a este microorganismo tiene relación con la ocurrencia del fenotipo “adherencia-borramiento-eliminación” (A/E) sobre la membrana celular del epitelio implicado, involucrando cambios que incluyen la acumulación de actina polimerizada, actina y miosina, por debajo de las bacterias adheridas (81).

La importancia de este fenómeno se ha estudiado con mucha mayor amplitud en EPEC, en la resulta más significativo que en STEC, desde el punto de vista de sus respectivas patogenias (103).

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 (103). La lesión A/E también se ha detectado en procesos infecciosos ocasionados por *Hafnia alvei* y *Citrobacter rodentium* (5, 125, 131).

Es importante comentar que la histopatología A/E asociada a STEC sólo se ha observado en cerdos gnotobióticos (38, 96, 153), en conejos infantiles (127) y en cultivos de células epiteliales (81), 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 STEC, 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 (103).

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 (103).

c) Patologías asociadas a STEC

Cuando una misma bacteria es capaz de provocar distintos cuadros patológicos a su hospedero, los factores a analizar tienen que ver con la cantidad de células bacterianas que se establecen y reproducen en el tejido implicado (lo que a su vez hace viable la sensación de quórum esencial en la producción de toxinas), la expresión o represión de diferentes genes, la virulencia de las cepas que coloniza y, desde luego, las condiciones de la defensa del propio individuo. En tal sentido, STEC provoca diferentes enfermedades, cuyas gravedades varían notablemente, en un amplio 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 (103).

Incuestionablemente, el serotipo O157:H7 de STEC es 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 (103).

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

Tabla 2. Entidades clínicas ocasionadas por STEC (9, 56, 103).

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.

Infección asintomática y diarrea sin sangre

Los casos de infección asintomática por *E. coli* O157:H7 han sido detectados ocasionalmente en diversos brotes, aunque ha resultado complicado estimar su incidencia, debido a que las muestras fecales de las personas implicadas rara vez son recolectadas para su cultivo (103).

Eventualmente, se han reportado casos de diarrea sin sangre que evolucionan a CH. No obstante, los análisis microbiológicos practicados

a evacuaciones sin sangre –asociadas a brotes- han demostrado que la frecuencia de *E. coli* O157:H7 es relativamente pequeña (103).

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. (103)

En contraste con lo anterior, los pacientes con deposiciones sanguinolentas experimentan diarrea, vómito y dolor abdominal, durante períodos más prolongados (103).

Colitis hemorrágica (CH)

Sintomatología. En general, las infecciones por *E. coli* O157:H7 manifiestan dolor abdominal severo -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 shigelosis, amibiasis, campilobacteriasis y los cuadros provocados por *E. coli* enteroinvasiva (143).

Los análisis radiológicos y endoscópicos de la mucosa colónica muestran edema, erosión o hemorragia y las deposiciones evidencian ausencia de microorganismos entéricos convencionales (143).

Este síndrome fue reportado en 1971, en referencia a cinco jóvenes adultos que desarrollaron colitis segmental reversible, de la cual se recuperaron dos semanas después sin haberse administrado alguna terapia específica. El término “colitis evanescente” fue empleado inicialmente para describir a esta entidad clínica y diferenciarla de las colitis ulcerativa, granulomatosa e isquémica (99).

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 en 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 (143).

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 (143).

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 sanguinolenta -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 (143).

Datos de laboratorio. Los estudios de laboratorio suelen mostrar leucocitosis, con recuentos medios de 13 a 14 x 10⁹ leucocitos/L; 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” (143).

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 (143).

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) (143).

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 pueden acompañarse por dolor abdominal, vómito, fiebre y letargo, e inclusive, pólipos cecales, intususcepción (introducción del intestino delgado en el grueso) y apendicitis (103).

Descrito inicialmente por Gasser en 1955 (48), 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 (121). Al parecer, sus principales factores predisponentes incluyen componentes de orden genético, el embarazo, la administración de diversos fármacos (tales como los antibióticos, los anticonceptivos orales y los estrógenos), amén de la edad, las gastrectomías previas y otras causas de inmunocompromiso (160).

Con base en datos epidemiológicos y de laboratorio, el síndrome aparenta dividirse en dos categorías: el típico o epidémico y el atípico o esporádico y ocurre de manera predominante en los recién nacidos y en los niños de corta edad –en quienes el daño renal agudo resulta más frecuente- (9, 103).

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 (9, 103).

Las complicaciones gastrointestinales más comunes del HUS incluyen inflamación inespecífica, colitis isquémica crónica con estrechez colónica y necrosis global que conduce a 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 (103, 112).

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 (35, 120).

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 (103).

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 clones que

presentan los genes asociados a la Stx2, la cual es considerada más peligrosa que la Stx1 (30).

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 estimulan 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 (121).

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, aquélla resultó insuficiente para neutralizar la reinfección por STEC y la acción de su citotoxina (136).

El aislamiento del microorganismo a partir de las regiones extraintestinales es 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 (145).

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) (9).

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 (9).

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.

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 (9).

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 (9).

d) Epidemiología

El nombre del microorganismo se debe a los trabajos de Theodor Escherich, quien lo describió en 1880, relacionándolo con su predominante ubicación en el colon de los humanos y de diversos animales. En ese entonces, se desconocían sus efectos patológicos a nivel intestinal y gradualmente se le reconoció su virulencia, aunque inicialmente solo se le demostraron capacidades patogénicas cuando abandonaba el tracto digestivo y alcanzaba la sangre, el aparato urinario y el sistema nervioso, en particular el líquido cefalorraquídeo. Las características epidemiológicas establecidas en la actualidad implican la posibilidad de que el intestino del ganado represente un reservorio natural de STEC 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 (74, 103).

Sin lugar a dudas, los grandes brotes epidémicos llegan a afectar a cientos de personas, aunque no debe soslayarse el hecho de que también ocurren casos esporádicos de infección por STEC, sobre todo en el norte de los Estados Unidos y en el oeste de Canadá (20, 21, 123).

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 (32, 58, 155).

El CDC estima que el número de afecciones ocasionadas por *E. coli* O157:H7 rebasa en E.U.A. los 70,000 casos anuales, de los cuales 60 a 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 (28).

Evidentemente, *E. coli* O157:H7 y otros serotipos de STEC pueden provocar diarrea común no hemorrágica, colitis hemorrágica severa o HUS, en cualquier caso con espasmos abdominales y sin fiebres elevadas. Entre los pacientes con diarrea, el 4% o más desarrollan HUS, condición caracterizada por anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia y falla renal aguda. Sin embargo, es claro que el serotipo O157:H7 ocasiona entre el 70 y 80% de todos los cuadros causados por cepas de STEC y es al que se le reconoce como una causa particularmente importante de diarrea sanguinolenta en los países desarrollados, aunque se subraya que no todos los laboratorios clínicos se encuentran preparados para reconocer a este agente etiológico.

Hace poco menos de dos décadas, 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* (27).

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.(28).

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

STEC O157 se ha encontrado en la leche y la carne de res, por lo que la carne molida es la más frecuente fuente de transmisión. No obstante, también 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 pHs ácidos (6, 31, 33).

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. Algunos brotes recientes en Virginia y Michigan fueron asociados al consumo de germinados de alfalfa, cuyas semillas se habían adquirido al mismo distribuidor (158).

Por obvio, los sistemas municipales de agua también han fungido como focos infecciosos de epidemias, ligados principalmente a fallas en la cloración (89); 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 (77).

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 (77).

Adicionalmente, la sobrevivencia de STEC 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 (146). 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 (11), mientras que, en Alemania, la media calculada para enfermos de HUS fue de 21 días, con un rango de 5 hasta 124 días (69).

STEC 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, hospitales, etc (103). La dosis infectiva es particularmente baja, de solo 100 a 200 UFC (49).

E. coli O157:H7 se ha aislado a partir de agua contaminada, ganado vacuno, borregos, caballos, perros, carne de puerco, carnero, venado, pollo, mariscos, leche bronca, lechuga, mayonesa, jugo de manzana no pasteurizado y salami fermentado, entre otros (1, 14, 26, 28, 31, 49, 51, 77, 95, 103).

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- (12, 103).

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 contaminados (60, 141).

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 (34).

e) Importancias de los serotipos no-O157:H7

El hecho de que las cepas O157:H7 hayan ocasionado la mayor parte de los brotes epidémicos asociados a STEC, sugiere que dicho serotipo es el más virulento y/o el más transmisible (103). 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 (63, 67).

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 (103).

En resumen, las revisiones enfocadas específicamente a los serotipos no-O157:H7 de STEC han logrado establecer lo siguiente (17, 51, 58, 63, 90, 103, 111, 118, 155):

- 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.
- 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 diversos brotes, en Japón, Alemania, Italia, Australia, República Checa y E.U.A.
- Si bien se ha sugerido que estos serotipos sólo ocasionan el 20 a 25% de los casos de HUS en Norteamérica, cabe considerar que, en algunas zonas de países tales como Chile, Argentina, y

Australia, representan el principal agente etiológico de dicha enfermedad.

- Las cepas no-O157:H7 también causan 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%).
- Los serogrupos más frecuentemente recibidos en el CDC de los Estados Unidos entre 2003 y 2010 fueron el O26, O103, O111, O121, O45 y O145.
- La 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.

III. FACTORES DE VIRULENCIA

El estudio de los mecanismos de patogenicidad de los principales agentes etiológicos representa el principal instrumento para establecer las formas de interacción, la razón de las alteraciones que se presentan durante el padecimiento y, desde luego, las moléculas que determinan la persistencia del microorganismo, a fin de estar en posibilidad de diseñar nuevas formas terapéuticas y de diseñar vacunas razonadas con mayor eficacia. La mayor parte de los trabajos tendientes a determinar los factores de virulencia de STEC se han enfocado primordialmente al estudio de la Stx, la cual se encuentra codificada en el bacteriófago lisogénico 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 STEC del serotipo O157:H7 (103).

Desafortunadamente, las respuestas celulares que se traducen en la histopatología A/E asociada a STEC no han sido analizadas tan extensamente como las que dan lugar a dicho fenotipo en EPEC; sin embargo, también suelen evidenciarse niveles importantes de calcio intracelular y elevadas concentraciones de actina polimerizada en las mucosas colonizadas por STEC (59, 81). En lo que sí se observan

relevantes diferencias respecto a los fenómenos originados por EPEC, es en el hecho de que STEC no promueve la fosforilación de la tirosina en las proteínas embebidas en las células epiteliales y en que las cepas STEC *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 (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 EPEC como en STEC 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 (62).

Tal como sucede en EPEC, 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- (43); lo anterior

debe tomarse en cuenta, ya que se han detectado cantidades notables de IL-8 en respuesta a las infecciones por STEC (65).

a) Toxinas de Shiga

Las Stx corresponden a exotoxinas del tipo A-B, cuyo fragmento tóxico A escinde a las moléculas de rRNA, impidiendo la síntesis proteica de las células humanas a nivel de la traducción; de hecho constituye el principal factor de patogenicidad y la característica distintiva de STEC, ya que se trata de la razón del fallecimiento de numerosos pacientes y de diversos síntomas de las enfermedades asociadas al microorganismo (73, 103).

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 (73, 103).

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 (109); los prototipos Stx1 y Stx2 manifiestan una identidad de sólo 55 y 57% en las subunidades A y B, respectivamente (61).

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. (22).

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 (103).

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 (119, 148).

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 (128).

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-glicosidasa que elimina un solo residuo de adenina del RNA 28S de los ribosomas, con lo cual inhibe la síntesis proteica (103).

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 (103).

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 (103).

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 (103).

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 (102, 104, 108); no obstante, los datos no pudieron ser confirmados y, actualmente, sólo se acepta que, además de *Shigella* y STEC, muy contadas cepas de *Citrobacter freundii* y *Enterobacter spp* elaboran Stx2 y cuentan con genes *stx2* homólogos a los detectados en STEC (114, 134).

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 (106). A este respecto, el posible mecanismo de la secreción de fluidos involucra la muerte selectiva de las células que contienen a los vellos absortivos (76): 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 (66). Esta evidencia sugiere que, a diferencia de la TL (de ETEC) y la CT (de *V. cholerae*), la Stx no promueve la secreción activa de iones Cl^- (103); 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) (10, 124).

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 (137) 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.

Análogamente, Fontaine y cols. (45) 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.

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 (45).

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 (153, 154). En conejos pequeños, la administración oral de una mutante O157: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 (88).

La conclusión que abarca todos los estudios realizados en los diferentes modelos es la siguiente: la capacidad de STEC 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 (103).

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 (3). 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 (49).

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- (10, 124). 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 (19).

Adicionalmente, la Stx es citotóxica *-in vitro* e *in vitro*- para las células endoteliales del riñón humano (93): la típica histopatología renal incluye edema en las células del endotelio glomerular y la deposición de plaquetas y fibrina dentro del glomérulo (101). 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 (93); 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 (103).

Los estudios epidemiológicos indican que la Stx2 es más importante que la Stx1 en el desarrollo del HUS (49); 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 (117).

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- (29, 93, 98).

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 (54, 147); el TNF- α y la IL-1 β pueden mejorar *in vitro* el efecto citotóxico de la Stx sobre las células endoteliales vasculares humanas (75, 92) 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 (156).

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 (157).

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 (103).

Por último, es interesante señalar que, siendo exotoxinas del tipo A-B (tipo III), una vez que reconocen a su receptor Gb3, la subunidad A se une al rRNA del enterocito impidiéndole la síntesis proteica. No obstante, existen indicios de que la subunidad B, al unirse al globotriacilceramida (Gb3), podría provocar la transducción de señales que desencadenarían la apoptosis de las células hospederas, fenómeno que se sumaría a la afectación de la síntesis de proteínas por la subunidad A que impediría la producción de moléculas inhibitoras de dicha muerte celular programada (103).

b) Enterotoxina EAST1

Esta toxina, descrita inicialmente como producto de EAGGEC (EAST1 = toxina termoestable 1 de *E. coli* enteroagregativa), también se ha detectado en STEC: 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 (129).

El significado de la EAST1 en la patogénesis de las enfermedades ocasionadas por STEC 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 (103).

c) Enterohemolisina

El plásmido de 60 MDa encontrado en las cepas de *E. coli* O157:H7 también contiene los genes que codifican para la enterohemolisina (132). Por ejemplo, en Alemania, aproximadamente el 90% de las cepas Stx-positivas aisladas de pacientes poseían los genes correspondientes (13) y, según otro estudio, en el que se investigaron cepas O111 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 (133).

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 (132).

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 (103, 133). En tal contexto, otras dos hemolisinas codificadas en bacteriófagos, denominadas Ehly1 y Ehly2, son producidas por numerosas cepas de *E. coli* productoras de Stx (16, 139).

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* (103).

d) Factores que sustentan la 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* (103).

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 (103).

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 (91).

En cuanto a la *eaeB*, ésta codifica para la secreción de una proteína de 37 kDa, denominada Tir, la cual resulta muy representativa de la acción evolutiva de este microorganismo, ya que es translocada para que se incorpore a la superficie de los enterocitos, a fin de que funcione como receptora de intimina y, consecuentemente se produzcan las lesiones A/E (46).

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 (ligada a la Tir) son: los enfermos con HUS presentan anticuerpos anti-intimina y la virulencia de las cepas de EPEC (analizadas en voluntarios

humanos) se pierde o disminuye notablemente cuando se han producido mutaciones en el gen *eae* (103).

Evidentemente, los supuestos receptores para la intimina pueden variar dependiendo del serotipo y hasta se ha planteado la hipótesis de que la secuencia de aminoácidos implicada en cada uno explicaría por qué EPEC coloniza los intestinos grueso y delgado de los lechones, mientras STEC sólo lo hace en el colon; de hecho, cuando el *eae* de EPEC se clona en mutantes STEC carentes de dicho gen, la cepa resultante expresa la intimina y la Tir de EPEC que originan el fenotipo A/E en ambas regiones intestinales y promueve un volumen notablemente mayor de las evacuaciones (103, 162).

Si bien los mencionados cambios de *eae* -entre EPEC y STEC- son indicativos de la relevancia de la intimina (y su respectivo complemento Tir) en la colonización del intestino, aún debe establecerse si las fimbrias también desempeñan algún papel en la adherencia del serotipo O157: H7 (103).

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* (42, 103).

Evidentemente, se han detectado otras probables adhesinas de *E. coli* O157:H7, cuyos respectivos papeles aún no se han comprobado: Sherman y cols (135) 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 y cols (144) sugirieron 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 (39).

STEC, tal como también ocurre con EPEC, origina alteraciones histopatológicas en el intestino, conocidas genéricamente como lesiones A/E (adherencia y borramiento o eliminación, del inglés *attaching and effacing*) las cuales conducen a la degeneración de las microvellosidades y modificación anormal de la región apical del enterocito (103).

La adherencia inicial del microorganismo a los enterocitos aún incluye eventos desconocidos. Sin embargo, se ha detectado que una vez que la bacteria se ha adherido, inyecta la Tir en la membrana de la célula hospedera, a través de una serie de proteínas bacterianas que integran el sistema de secreción tipo III (SSTT), la gran mayoría de las cuales se encuentra codificada en el LEE (62, 103).

Éste contiene cinco operones policistrónicos (LEE₁ a LEE₅) que forman tres dominios de virulencia en los que están codificados los siguientes genes: a) los operones LEE₁, LEE₂ y LEE₃ que incluyen a los genes de las proteínas del SSTT, las cuales forman un complejo de aguja (CA); b) Los LEE₄, que codifican para otras proteínas que participan en la translocación; y c) LEE₅ que contiene a los genes de la intimina y del propio receptor de esta última (la multicitada proteína Tir (53).

Las proteínas del SSTT forman el CA, estructura que atraviesa la membrana interna, el espacio periplásmico y la membrana externa de la bacteria, y se prolonga hasta la membrana citoplásmica del enterocito, permitiendo en su parte interna la secreción de proteínas (incluida la Tir). Cabe señalar que el CA corresponde a una compleja maquinaria macromolecular cuya estructura y función están

conservados en numerosos patógenos Gram negativos, tales como *Yersinia*, *Shigella*, *Salmonella* y EPEC y STEC. Su plataforma inicia con la unión de la proteína EscV a la membrana interna y la de EscC a la membrana externa. A continuación se agregan otros componentes de membrana interna (EscR, EscS, EscT y EscU) que completan la base primaria. La proteína EscN se incorpora como el componente citosólico del SSTT y funge como una ATPasa citoplásmica que provee de la energía necesaria al sistema. La lipoproteína EscJ conecta a toda esa estructura con la proteína EscC en la membrana externa y forma un conducto cilíndrico que atraviesa el espacio periplásmico, a través del cual pasa la proteína EscF para establecerse finalmente como la punta del CA. (23, 161).

En seguida, a través del CA pasan tres proteínas codificadas en el LEE, conocidas como proteínas translocadoras: la primera, EspA, se ensambla directamente con EscF y se polimeriza en la punta o región distal del CA, lo que permite que la aguja molecular se extienda hasta formar un puente físico que posibilita el contacto entre la bacteria y la membrana de la célula. De esa manera, pueden pasar las proteínas EspB y EspD y se completa el translocón-SSTT, que conecta y permite la interacción entre bacteria y célula hospedera ya que, a través de él, la primera inyecta sobre la segunda a la proteína Tir y a otras moléculas participantes en la patogenicidad (23).

Dichas proteínas efectoras se han dividido para su estudio en proteínas codificadas en el LEE (EspF, EspG, EspH, EspZ, Map y Tir) y las no codificadas en el LEE (Cif, EspG2, NleC y NleD). EspF redistribuye a las proteínas de las uniones estrechas intercelulares, a fin de atenuar la resistencia transepitelial. EspG y EspG2 degradan la red de microtúbulos por debajo de donde se encuentra la bacteria adherida a la célula. Por su parte, EspH modula la estructura del citoesqueleto de actina, así como la formación de filopodios durante la lesión A/E. EspZ se acumula en las zonas en donde se forman los pedestales de actina, si bien aun no se ha demostrado que desempeñe un papel específico en la patogénesis. Por último, Map se ubica junto a proteínas de la mitocondria, alterando el potencial de membrana y propiciando la liberación del citocromo C, con lo cual se desencadena la apoptosis (23).

Sin lugar a dudas, la inyección de Tir representa un paso crucial durante la lesión A/E y la formación de los pedestales. Su desplazamiento a través del translocón-SSTT incluye la protección por una chaperona específica denominada CesT. Una vez en el citosol, un fragmento central de la Tir (su dominio hidrofóbico) se inserta en la membrana plasmática del enterocito, dejando expuesto hacia el espacio extracelular un fragmento de 107 aminoácidos, conocido como TIBA (área de unión a intimina), con el que se enlaza a la

intimina bacteriana, la cual corresponde a proteína de membrana externa (23).

La etapa final de la infección es la formación de los pedestales de actina: tras la unión de la intimina a la Tir, ésta es fosforilada en el residuo 474 por una proteína de la familia Src-cinasa, denominada c-Fyn y, de esa manera, la Tir recluta a la proteína adaptadora Nck, la cual atrae y activa a otras proteínas reguladoras del citoesqueleto, entre las que destacan la WASP (por proteína del síndrome de Wiskott-Aldrich) y las que conforman el complejo Arp2/3. Éstas, al activarse, atraen la polimerización de actina hacia la zona en donde se localiza la Tir fosforilada, lo que desencadena toda una reorganización del citoesqueleto (23).

Los pedestales se forman debajo de la bacteria y se componen principalmente de actina polimerizada y otras proteínas relacionadas, tales como actinina a, fimbrina, miosina, talina y ezrina. Evidentemente, dicha reorganización del citoesqueleto altera la fisiología y morfología de la región apical de las células intestinales, lo que conduce a su disfunción y a la pérdida de las microvellosidades (23).

e) Plásmido pO157

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 (132). 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 STEC (87).

El pO157 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 (47, 103).

Con respecto a su papel en la patogénesis de las enfermedades ocasionadas por STEC, diversas publicaciones resultan contradictorias entre sí. Karch y cols (68) reportaron que el pO157 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 (103). Dytoc y cols 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 (41).

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 (133).

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 STEC. 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 (87). En Europa, las cifras encontradas resultaron muy similares a las antes mencionadas (159).

Las cepas *E. coli* O157:H7 no son fermentadoras de sorbitol en 24 h, por lo tanto la selección diferencial sobre agar MacConkey- sorbitol, es muy efectivo en el aislamiento de este patógeno en las deposiciones sanguíneas (55).

f) 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 (110), 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 (97).

g) 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 (100). 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) (152). 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 (100, 152).

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 (103).

IV. PREVENCIÓN y TRATAMIENTO

a) Medidas higiénicas de prevención

La disminución en la transmisión primaria de STEC 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, 140).

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 (103).

Además, todas las frutas y leguminosas que se consumen crudas deben ser desinfectadas, para que puedan consumirse sin riesgo de infección (103).

b) Prevención relacionada con la elaboración y aplicación de vacunas

Hasta el momento actual no se han diseñado vacunas eficaces que protejan contra STEC. 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 (103).

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 (94).

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 (2, 52).

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 (44, 79).

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 (4, 82).

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 (103).

c) Tratamiento

Los regímenes terapéuticos asociados a los padecimientos ocasionados por STEC 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 (103).

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 (122); 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 (57).

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 (103).

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 (24, 103, 116):

- 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.

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 (84, 113).

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 (84).

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 (30).

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 (103). 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 (7).

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 plasmoféresis como la administración intravenosa de plasma deben realizarse de manera intermitente y se consideran como las medidas requeridas con mayor frecuencia (103).

V. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

Se han aislado más de 150 serotipos de STEC (tabla 3 y 4) asociados a diarrea o HUS, si bien se reconoce ampliamente que el O157:H7 es el principal causante de HUS en Norteamérica y de diarrea sanguinolenta en diversos países en donde, sin embargo, el O111:NM y el O26:H11 también figuran. Cabe señalar que, entre 2003 y 2008, el 71% de los serotipos no-O157 que fueron hallados en laboratorios de referencia del CDC, perteneció al O26, O103, O111, O121, O45 y O145. Por lo general, la detección de STEC en el laboratorio requiere del aislamiento del microorganismo a partir de las evacuaciones del enfermo, principalmente cuando se trata de deposiciones sanguinolentas y al margen de que éstas provengan de niños o adultos (103).

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, STEC no fermenta dicho carbohidrato (56, 103).

Es decir, la elección de colonias sorbitol-negativo ayuda a simplificar la detección y permite ahorrar importantes cantidades de los sueros hiperinmunes correspondientes (103).

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 STEC, 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 (103, 163).

Otro medio sólido propuesto es el elaborado con 4-metilumbeliferil- β -D-glucurónido (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 STEC no-O157 (103, 149).

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 (103).

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 STEC (consultar la tabla 4) (103).

Tabla 3. Serotipos de ETEC, EPEC y EIEC

ETEC		EPEC		EIEC	EAGGEC
O6:NM	O63:H12	O55:NM	O125:H21	O28:NM	O3:H12
O6:H16	O78:H11	O55:H6	O:126:NM	O29:NM	O15:H18
O8:H9	O78:H12	O55:H7	O126:H27	O112:NM	O44:H18
O15:H11	O128:H7	O86:NM	O127:NM	O124:NM	O51:H11
O20:NM	O148:H28	O86:H34	O127:H6	O124:H7	O77:H18
O25:NM	O153:H45	O111:NM	O127:H9	O124:H30	O86:H2
O25:H42	O159:NM	O111:H2	O127:H21	O136:NM	O111ab:H21
O27:NM	O159:H4	O111:H12	O128:H2	O143:NM	O126:H27
O27:H7	O159:H20	O111:H21	O128:H7	O144:NM	O141:H49
O27:H20	O167:H5	O114:NM	O128:H12	O152:NM	ONT:H21
O49:NM	O169:NM	O114:H2	O142:H6	O164:NM	ONT:H33
	O169:H41	O119:H6	O157:H45	O167:NM	
				ONT:NM	

Tabla 4. Serotipos de STEC

STEC			
O8:H19	O91:H21	O118:H16	O153:H25
O22:H8	O103:NM	O119:NM	O156:H25
O26:NM	O103:H2	O119:H4	O157:NM
O26:H11	O103:H11	O119:H25	O157:H7
O28:H25	O103:H25	O121:H19	O165:NM
O45:H2	O104:H7	O123:NM	O165:H25
O55:H7	O104:H21	O123:H11	O172:NM
O69:H11	O111:NM	O128:NM	O174:H21
O76:H19	O111:H2	O128:H2	O174:H28
O84:NM	O111:H8	O128:H45	O177:NM
O88:H25	O113:H21	O145:NM	O178:H19
O91:NM	O118:H2	O146:H21	O179:H8
O91:H14	O118:H12	O153:H2	

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 (103).

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 STEC no-O157- de otras *E. coli* que sólo sintetizan una α -hemolisina (103).

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 (103).

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 sinteticen Stx (103).

La necesidad de trasladar a los microorganismos identificados como STEC a los laboratorios de referencia tiene que ver con el tiempo,

costos y experiencia del personal, así como con fines específicamente epidemiológicos (103).

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 (103).

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. Por lo que se refiere a la PCR, los primers empleados están dirigidos contra los genes *slt1* y *slt2* y se manejan 30 ciclos de desnaturalización (95°C), alineamiento (60°C) y elongación (72°C), así como una desnaturalización inicial de 5 minutos (previa a que empiecen los 30 ciclos) y una elongación final por 10 minutos. Otras metodologías moleculares incluyen secuenciaciones del DNA y el empleo de sondas marcadas complementarias a los genes para las Stx (15, 25, 37, 142, 151).

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. (150), así como el inmunoensayo de LMD Laboratories (40); 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 STEC; 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 (78).

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 (103).

CONCLUSIONES

1. No existen motivos para sugerir que STEC no se puede establecer en el intestino de individuos mexicanos. El hecho de que se hayan detectado brotes en otros países latinoamericanos debe alertar a los equipos de salud y a los laboratorios clínicos del país, para detectar su probable participación como causante de padecimientos intestinales y renales.
2. STEC produce diversos factores de virulencia reconocidos en EPEC y, además, una o más toxinas de Shiga, principales factores desencadenantes de hemorragias, HC, HUS y PTT. Ello propone una evolución de EPEC a STEC, al adquirir al bacteriófago StxΦ.
3. Los alimentos y bebidas que fungen como importantes fuentes de STEC son la carne de puerco, reses, bovinos, caballo, perro, venado, pollo; leche bronca y sus derivados; lechuga, rábanos, jitomate, alfalfa, mayonesa, jugo de manzana y salami.
4. La prevención de las patologías por STEC incluyen hervir el agua y la leche, cocer suficientemente los cárnicos y desinfectar las frutas y leguminosas.

-
5. La diarrea por STEC se relaciona con las lesiones A/E producidas por EPEC y la generación de los cuadros hemorrágicos, así como la falla renal, se deben a la acción de las Stx.

 6. El serotipo más importante de STEC es el O157:H7, pero muchos otros también producen las toxinas de Shiga, aunque su incidencia en las patologías humanas resulta evidentemente menor.

 7. La terapéutica de las enfermedades ocasionadas por STEC es de dudosa eficacia. Sin embargo, la diarrea debe tratarse mediante la restitución de agua y electrolitos, ya que la acción de los antibióticos aparenta agravar los cuadros; la anemia requiere de la transfusión de paquete eritrocitario e infusión de plaquetas y el daño renal obliga a la diálisis y, en los casos de mayor gravedad, al trasplante renal.

 8. La familia de toxinas Stx pertenece a las exotoxinas A-B. Su fragmento B reconoce como su receptor al glucoesfingolípidio Gb3 presente en diversas células eucariontes y la subunidad A1 inhibe la síntesis proteica, lo cual suele traducirse en la activación de la apoptosis.

-
9. La detección de la Stx es fundamental para la realización del diagnóstico de laboratorio, debiéndose considerar que la Stx1 y la Stx2 no cruzan antigénicamente. La segunda es más virulenta, pero las cepas de STEC pueden sintetizar una de ellas o ambas.

 10. Al ingresar a la sangre, la Stx origina lesiones endoteliales que se traducen en el estrechamiento de la luz de los capilares y la oclusión de los vasos glomerulares, debido a la acumulación de plaquetas y fibrina; por tales motivos ocurren la reducción de la filtración glomerular y la falla renal aguda, la fragmentación de los eritrocitos, la trombosis y la microangiopatía.

 11. Las pruebas inmunológicas más empleadas para detectar a las Stx son las de ensayo inmunoenzimático y la aglutinación en látex. El microorganismo suele detectarse con base a que no fermenta el sorbitol y su serotipificación requiere de reacciones de aglutinación con sueros anti-O y anti-H.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ackers, M. L.; Mahon, B. E.; Leahy, E.; Goode, B.; Damrow, T.; Hayes, P. S.; Bibb, W. F.; Rice, D. H.; Barrett, T. J.; Hutwagner, L.; Griffin, P. M. & Slutsker, L.: An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with leaf lettuce consumption. *Journal of Infectious Diseases* 1998, 177(6):1588-1593.
2. Acheson, D. W.; Levine, M. M.; Kaper, J. B. & Keusch, G. T.: Protective immunity to Shiga-like toxin I following oral immunization with Shiga-like toxin I B-subunit-producing *Vibrio cholerae* CVD 103-HgR. *Infection and Immunity* 1996, 64(1):355-357.
3. Acheson, D. W.; Moore, R.; Breucker, S. D.; Lincicome, L.; Jacewicz, M.; Skutelsky, E. & Keusch, G. T.: Translocation of Shiga toxin across polarized intestinal cells in tissue culture. *Infection and Immunity* 1992, 64(8):3294-3300.
4. Ahmed, A.; Li, J.; Shiloach, Y.; Robbins, J. B. & Szu, S. C.: Safety and Immunogenicity of *Escherichia coli* O157 O-Specific Polysaccharide Conjugate Vaccine in 2-5-Year-Old Children. *Journal of Infectious Diseases* 2006, 193(4):515-521.
5. Albert, M. J.; Faruque, S. M.; Ansaruzzaman, M.; Islam, M. M.; Haider, K.; Alam, K.; Kabir, I. & Robins-Browne, R.: Sharing of virulence-associated properties at the phenotypic and genetic levels between enteropathogenic *Escherichia coli* and *Hafnia alvei*. *Journal of Medical Microbiology* 1992, 37(5):310-314.
6. Arias, M. L.; Monge-Rojas, R.; Antillón, F. & Chaves, C.: Growth and survival of *Escherichia coli* O157: H7 in meat, poultry and vegetables mixed with different concentrations of mayonnaise. *Revista de Biología Tropical* 2001, 49(3-4):1207-1212.
7. Armstrong, G. D.; Rowe, P. C.; Goodyer, P.; Orrbine, E.; Klassen, T. P.; Wells, G.; MacKenzie, A.; Lior, H.; Blanchard, C.; Auclair, F.; Thompson, B.; Rafter, D. J. & McLaine, P. N.: A Phase I Study of Chemically Synthesized Verotoxin (Shiga-like Toxin) Pk-Trisaccharide Receptors Attached to Chromosorb for Preventing Hemolytic-Uremic Syndrome. *Journal of Infectious Diseases* 1995, 171(4):1042-1045.
8. Ault, A. & Morris, K.: USA acts to contain potential *E. coli* disaster. *The Lancet* 1997, 350(9077):567.

-
9. Barbour, T.; Johnson, S.; Cohney, S. & Hughes, P.: Thrombotic microangiopathy and associated renal disorders. *Nephrology Dialysis Transplantation* 2012, 27(7):2673-2685.
 10. Barrett, T. J.; Potter, M. E. & Wachsmuth, I. K.: Continuous Peritoneal Infusion of Shiga-like Toxin II (SLT II) as a Model for SLT II-Induced Diseases. *Journal of Infectious Diseases* 1989, 159(4):774-777.
 11. Belongia, E. A.; Osterholm, M. T.; Soler, J. T.; Ammend, D. A.; Braun, J. E. & MacDonald, K. L.: Transmission of *Escherichia coli* O157:H7 infection in Minnesota child day-care facilities. *The Journal of the American Medical Association* 1993, 269(7):883-888.
 12. Bell, B. P.; Goldoft, M.; Griffin, P. M.; Davis, M. A.; Gordon, D. C.; Tarr, P. I.; Bartleson, C. A.; Lewis, J. H.; Barrett, T. J.; Wells, J. G.; Baron, R. & Kobayashi, J.: A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7-associated bloody diarrhea and hemolytic uremic syndrome from hamburgers: the washington experience. *The Journal of the American Medical Association* 1994, 272(17):1349-1353.
 13. Beutin, L.; Aleksic, S.; Zimmermann, S. & Gleier, K.: Virulence factors and phenotypical traits of verotoxigenic strains of *Escherichia coli* isolated from human patients in Germany. *Medical Microbiology and Immunity* 1994, 183(1):13-21.
 14. Beutin, L.; Geier, D.; Steinrück, H.; Zimmermann, S. & Scheutz, F.: Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-like toxin)-producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy domestic animals. *Journal of Clinical Microbiology* 1993, 31(9):2483-2488.
 15. Beutin, L.; Steinrück, H.; Krause, G.; Steege, K.; Haby, S.; Hultsch, G. & Appel, B.: Comparative evaluation of the Ridascreen® Verotoxin enzyme immunoassay for detection of Shiga-toxin producing strains of *Escherichia coli* (STEC) from food and other sources. *Journal of Applied Microbiology* 2007, 102(3):630-639.
 16. Beutin, L.; Stroehler, U. H. & Manning, P. A.: Isolation of enterohemolysin (Ehly2)-associated sequences encoded on temperate phages of *Escherichia coli*. *Gene* 1993, 132(1):95-99.
 17. Bokete, T. N.; O'Callahan, C. M.; Clausen, C. R.; Tang, N. M.; Tran, N.; Moseley, S. L.; Fritsche, T. R. & Tarr, P. I.: Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* in Seattle children: a prospective study. *Gastroenterology* 1993, 105(6):1724-1731.

-
18. Boyce, T. G.; Swerdlow, D. L. & Griffin, P. M.: *Escherichia coli* O157:H7 and the Hemolytic-Uremic Syndrome. *New England Journal of Medicine* 1995, 333(6):364-368.
 19. Boyd, B. & Lingwood, C.: Verotoxin receptor glycolipid in human renal tissue. *Nephron* 1989, 51(2):207-210.
 20. Bradley, K.; Williams, J.; Burnsed, L.; Lytle, M.; McDermott, M.; Mody, R.; Bhattarai, A.; Mallonee, S.; Piercefield, E.; McDonald-Hamm, C. & Smithee, L.: Epidemiology of a large restaurant-associated outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O111:NM. *Epidemiology and Infection* 2012, 140(9):1644-1654.
 21. Brooks, J. T.; Sowers, E. G.; Wells, J. G.; Greene, K. D.; Griffin, P. M.; Hoekstra, R. M. & Strockbine, N. A.: Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in the United States, 1983-2002. *The Journal of Infectious Diseases* 2005, 192(8):1422-1429.
 22. Calderwood, S. B.; Acheson, W. K.; G T Keusch; Barrett, T. J.; Griffin, P. M.; Strockbine, N. A.; Swaminathan, B.; Kaper, J. B.; Levine, M. M.; Kaplan, B. S.; Karch, H.; O'Brien, A. D.; Obrig, T. G.; Takeda, Y.; Tarr, P. I. & Wachsmuth, I. K.: Proposed new nomenclature for SLT (VT) family. *ASM News* 1996, 62:118-119.
 23. Campellone, K. G. & Leong, J. M.: Tails of two Tirs: actin pedestal formation by enteropathogenic *E. coli* and enterohemorrhagic *E. coli* O157:H7. *Current Opinion in Microbiology* 2003, 6(1):82.
 24. Carter, A. O.; Borczyk, A. A.; Carlson, J. A. K.; Harvey, B.; Hockin, J. C.; Karmali, M. A.; Krishnan, C.; Korn, D. A. & Lior, H.: A Severe Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7-Associated Hemorrhagic Colitis in a Nursing Home. *New England Journal of Medicine* 1987, 317(24):1496-1500.
 25. Castillo, B.; Rivera, G.; Azuara, J. C.; Martínez, M. A.; Bocanegra, V. & Cruz, W.: Detección de factores de patogenicidad de *E. Coli* enteropatógena y enterohemorrágica a partir de muestras de alimentos mediante PCR. *Bioquímica* 2007, 32(Suplemento A):116.
 26. CDC: *Escherichia coli* O157:H7 outbreak linked to commercially distributed dry-cured salami--Washington and California, 1994. *MMWR* 1995, 44(9):157-160.
 27. CDC: The Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 1996. *MMWR* 1997, 46(12):258-261.

-
28. CDC: Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet): FoodNet Surveillance Report for 2010 (Final Report). Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC 2011.
 29. Cimolai, N.; Basalyga, S.; Mah, D. G.; Morrison, B. J. & Carter, J. E.: A continuing assessment of risk factors for the development of *Escherichia coli* O157:H7-associated hemolytic uremic syndrome. *Clinical Nephrology* 1994, 42(2):85-89.
 30. Cimolai N, B. 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. *Clinical Nephrology* 1994, 42(2):85-89.
 31. Cody, S. H.; Glynn, M. K.; Farrar, J. A.; Cairns, K. L.; Griffin, P. M.; Kobayashi, J.; Fyfe, M.; Hoffman, R.; King, A. S.; Lewis, J. H.; Swaminathan, B.; Bryant, R. G. & Vugia, D. J.: An Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 Infection from Unpasteurized Commercial Apple Juice. *Annals of Internal Medicine* 1999, 130(3):202-209.
 32. Collins Njie, A. & Moses, M.: Detection of *Escherichia coli* O157:H7 virulence genes in isolates from beef, pork, water, human and animal species in the northwest province, South Africa: public health implications. *Research in Microbiology* 2010, 162(3):240-248.
 33. Conedera, G.; Mattiazzi, E.; Russo, F.; Chiesa, E.; Scorzato, I.; Grandesso, S.; Bessegato, A.; Fioravanti, A. & Caprioli, A.: A family outbreak of *Escherichia coli* O157 haemorrhagic colitis caused by pork meat salami. *Epidemiology and Infection* 2007, 135(2):311-314.
 34. Chart, H.: Are all infections with *Escherichia coli* O157 associated with cattle? *The Lancet* 1998, 352(9133):1005.
 35. Chinen, I.; Epszteyn, S.; Melamed, C. L.; Aguerre, L.; Espinosa, E. M.; Motter, M. M.; Baschkier, A.; Manfredi, E.; Miliwebsky, E. & Rivas, M.: Short communication: Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 in beef and chicken burgers, and chicken carcasses in Buenos Aires, Argentina. *International Journal of Food Microbiology* 2009, 132(2):167-171.
 36. Day, N. P.; Scotland, S. M.; Cheasty, T. & Rowe, B.: *Escherichia coli* O157:H7 associated with human infections in the United Kingdom. *Lancet* 1983, 1(8328):825.

-
37. Di, R. & Tumer, N. E.: Real-Time reverse transcription PCR detection of viable Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O157:H7 in food. *Journal of Food Safety* 2010, 30(1):51-66.
 38. Donnenberg, M. S.; Tzipori, S.; McKee, M. L.; O'Brien, A. D.; Alroy, J. & Kaper, J. B.: The role of the eae gene of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in intimate attachment in vitro and in a porcine model. *The Journal of Clinical Investigation* 1993, 92(3):1418-1424.
 39. Durno, C.; Soni, R. & Sherman., P.: Adherence of vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* serotype O157:H7 to isolated epithelial cells and brush border membranes in vitro: role of type 1 fimbriae (pili) as a bacterial adhesin expressed by strain CL-49. *Clinical and Investigative Medicine* 1989, 12(3):194-200.
 40. Dylla, B. L.; Vetter, E. A.; Hughes, J. G. & Cockerill, F. R.: Evaluation of an immunoassay for direct detection of *Escherichia coli* O157 in stool specimens. *Journal of Clinical Microbiology* 1995, 33(1):222-224.
 41. Dytoc, M.; Soni, R.; Cockerill, F.; De Azavedo, J.; Louie, M.; Brunton, J. & Sherman, P.: Multiple determinants of verotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 attachment-effacement. *Infection and Immunity* 1993, 61(8):3382-3391.
 42. Dytoc, M. T.; Ismaili, A.; Philpott, D. J.; Soni, R.; Brunton, J. L. & Sherman, P. M.: Distinct binding properties of eaeA-negative verocytotoxin-producing *Escherichia coli* of serotype O113:H21. *Infection and Immunity* 1994, 62(8):3494-3505.
 43. Elliott, E.; Li, Z.; Bell, C.; Stiel, D.; Buret, A.; Wallace, J.; Brzuszcak, I. & O'Loughlin, E.: Modulation of host response to *Escherichia coli* O157:H7 infection by anti-CD18 antibody in rabbits. *Gastroenterology* 1994, 106(6):1554-1561.
 44. Fan, H.; Wang, L.; Luo, J. & Long, B.: Protection against *Escherichia coli* O157:H7 challenge by immunization of mice with purified Tir proteins. *Molecular Biology Reports* 2011, 39(2):989-997.
 45. Fontaine, A.; Arondel, J. & Sansonetti, P. J.: Role of Shiga toxin in the pathogenesis of bacillary dysentery, studied by using a Tox- mutant of *Shigella dysenteriae* 1. *Infection and Immunity* 1988, 56(12):3099-3109.
 46. Foubister, V.; Rosenshine, I.; Donnenberg, M. S. & Finlay, B. B.: The eaeB gene of enteropathogenic *Escherichia coli* is necessary for signal transduction in epithelial cells. *Infection and Immunity* 1994, 62(7):3038-3040.

-
47. Fratamico, P. M.; Bhaduri, S. & Buchanan, R. L.: Studies on *Escherichia coli* serotype O157:H7 strains containing a 60-MDa plasmid and on 60-MDa plasmid-cured derivatives. *Journal of Medical Microbiology* 1993, 39(5):371-381.
 48. Gasser, C.; Gautier, E.; Steck, A.; Siebenmann, R. E. & Oechslin, R.: Hemolytic-uremic syndrome: bilateral necrosis of the renal cortex in acute acquired hemolytic anemia. *Schweizerische Medizinische Wochenschrift* 1955, 85(38-39):905-909.
 49. Griffin, P. M.: *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohemorrhagic *Escherichia coli*. In: *Infections of the Gastrointestinal Tract*. Edited by Blaser MJ, Smith PD, Ravdin JI, Greenberg HB, Guerrant RL. New York: Raven Press Ltd; 1995: 739-761.
 50. Griffin, P. M.; Olmstead, L. C. & Petras, R. E.: *Escherichia coli* O157:H7-associated colitis. A clinical and histological study of 11 cases. *Gastroenterology* 1990, 99(1).
 51. Griffin, P. M. & Tauxe, R. V.: The Epidemiology of Infections Caused by *Escherichia coli* O157: H7, Other Enterohemorrhagic *E. coli*, and the Associated Hemolytic Uremic Syndrome. *Epidemiologic Reviews* 1991, 13(1):60-98.
 52. Gu, J.; Ning, Y.; Wang, H.; Xiao, D.; Tang, B.; Luo, P.; Cheng, Y.; Jiang, M.; Li, N.; Zou, Q. & Mao, X.: Vaccination of attenuated EIS-producing *Salmonella* induces protective immunity against enterohemorrhagic *Escherichia coli* in mice. *Vaccine* 2011, 29(43):7395-7403.
 53. Haack, K. R.; Robinson, C. L.; Miller, K. J.; Fowlkes, J. W. & JL., J. L. M.: Interaction of Ler at the LEE5 (*tir*) operon of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* 2003, 71(1):384-392.
 54. Harel, Y.; Silva, M.; Giroir, B.; Weinberg, A.; Cleary, T. B. & Beutler, B.: A reporter transgene indicates renal-specific induction of tumor necrosis factor (TNF) by shiga-like toxin. Possible involvement of TNF in hemolytic uremic syndrome. *The Journal of Clinical Investigation* 1993, 92(5):2110-2116.
 55. Hayes, P. S.; Blom, K.; Feng, P.; Lewis, J.; Strockbine, N. A. & Swaminathan, B.: Isolation and characterization of a beta-D-glucuronidase-producing strain of *Escherichia coli* serotype O157:H7 in the United States. *Journal of Clinical Microbiology* 1995, 33(12):3347-3348.

-
56. Hermos, C. R.; Janineh, M.; Han, L. L. & McAdam, A. J.: Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in Children: Diagnosis and Clinical Manifestations of O157:H7 and Non-O157:H7 Infection. *Journal of Clinical Microbiology* 2011, 49(3):955-959.
 57. Higami, S.; Nishimoto, K.; Kawamura, T.; Tsuruhara, T.; Isshiki, G. & Ookita, A.: Retrospective analysis of the relationship between HUS incidence and antibiotics among patients with *Escherichia coli* O157 enterocolitis in the Sakai outbreak. *Kansenshogaku Zasshi – Journal of the Japanese Association for Infectious Diseases* 1998, 72(3):266-272.
 58. Isabel, C.; Sergio, E.; Celia, L. M.; Lorena, A.; Estela Martínez, E.; Mariana, M. M.; Ariela, B.; Eduardo, M.; Elizabeth, M. & Marta, R.: Short communication: Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 in beef and chicken burgers, and chicken carcasses in Buenos Aires, Argentina. *International Journal of Food Microbiology* 2009, 132(2):167-171.
 59. Ismaili, A.; Philpott, D. J.; Dytoc, M. T. & Sherman, P. M.: Signal transduction responses following adhesion of verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* 1995, 63(9):3316-3326.
 60. Itoh, Y.; Sugita-Konishi, Y.; Kasuga, F.; Iwaki, M.; Hara-Kudo, Y.; Saito, N.; Noguchi, Y.; Konuma, H. & Kumagai, S.: Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 present in radish sprouts. *Applied and Environmental Microbiology* 1998, 64(4):1532-1535.
 61. Jackson, M. P.; Newland, J. W.; Holmes, R. K. & O'Brien, A. D.: Nucleotide sequence analysis of the structural genes for Shiga-like toxin I encoded by bacteriophage 933J from *Escherichia coli*. *Microbial Pathogenesis* 1987, 2(2):147-153.
 62. Jarvis, K. G. & Kaper, J. B.: Secretion of extracellular proteins by enterohemorrhagic *Escherichia coli* via a putative type III secretion system. *Infection and Immunity* 1996, 64(11):4826-4829.
 63. Johnson, R. P.; Clarke, R. C.; Wilson, J. B.; Read, S. C.; Rahn, K.; Renwick, S. A.; Sandhu, K. A.; Alves, D.; Karmali, M. A.; Lior, H.; McEwen, S. A.; Spika, J. S. & Gyles, C. L.: Growing Concerns and Recent Outbreaks Involving Non-O157:H7 Serotypes of Verotoxigenic *Escherichia coli*. *Journal of Food Protection* 1996, 59(10):1112-1122.
 64. Johnson, W. M.; Lior, H. & Bezanson, G. S.: Cytotoxic *Escherichia coli* O157:H7 associated with haemorrhagic colitis in Canada. *The Lancet* 1983, 321(8314-8315):76.

-
65. Jung, H. C.; Eckmann, L.; Yang, S. K.; Panja, A.; Fierer, J.; Morzycka-Wroblewska, E. & Kagnoff, M. F.: A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion. *The Journal of Clinical Investigation* 1995, 95(1):55-65.
 66. Kandel, G.; Donohue-Rolfe, A.; Donowitz, M. & Keusch, G. T.: Pathogenesis of *Shigella* diarrhea. XVI. Selective targeting of Shiga toxin to villus cells of rabbit jejunum explains the effect of the toxin on intestinal electrolyte transport. *The Journal of Clinical Investigation* 1989, 84(5):1509-1517.
 67. Käppeli, U.; Hächler, H.; Giezendanner, N.; Beutin, L. & Stephan, R.: Human infections with non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, Switzerland, 2000-2009. *Emerging Infectious Diseases* 2011, 17(2):180-185.
 68. Karch, H.; Heesemann, J.; Laufs, R.; O'Brien, A. D.; Tacket, C. O. & Levine, M. M.: A plasmid of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 is required for expression of a new fimbrial antigen and for adhesion to epithelial cells. *Infection and Immunity* 1987, 55(2):455-461.
 69. Karch, H.; Rüssmann, H.; Schmidt, H.; Schwarzkopf, A. & Heesemann, J.: Long-term shedding and clonal turnover of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 in diarrheal diseases. *Journal of Clinical Microbiology* 1995, 33(6):1602-1605.
 70. Karmali, M. A.: Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews* 1989, 2(1):15-38.
 71. Karmali, M. A.; Petric, M.; Lim, C.; Fleming, P. C. & Steele, B. T.: *Escherichia coli* cytotoxin haemolytic-uraemic syndrome, and haemorrhagic colitis. *The Lancet* 1983, 322(8362):1299-1300.
 72. Karmali, M. A.; Petric, M.; Steele, B. & Lim, C.: Sporadic cases of haemolytic-uremic syndrome associated with faecal cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. *The Lancet* 1983, 321(8325):619-620.
 73. Kawano, K.; Okada, M.; Haga, T.; Maeda, K. & Goto, Y.: Relationship between pathogenicity for humans and stx genotype in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotype O157. *European Journal Of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication Of The European Society Of Clinical Microbiology* 2008, 27(3):227-232.
 74. Kawano, K.; Ono, H.; Iwashita, O.; Kurogi, M.; Haga, T.; Maeda, K. & Goto, Y.: Stx genotype and molecular epidemiological

-
- analyses of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7/H- in human and cattle isolates. *European Journal Of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication Of The European Society Of Clinical Microbiology* 2012, 31(2):119-127.
75. Kaye, S. A.; Louise, C. B.; Boyd, B.; Lingwood, C. A. & Obrig, T. G.: Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome: interleukin-1 beta enhancement of Shiga toxin cytotoxicity toward human vascular endothelial cells in vitro. *Infection and Immunity* 1993, 61(9):3886-3891.
 76. Keenan, K. P.; Sharpnack, D. D.; Collins, H.; Formal, S. B. & O'Brien, A. D.: Morphologic evaluation of the effects of Shiga toxin and E coli Shiga-like toxin on the rabbit intestine. *The American Journal of Pathology* 1986, 125(1):69-80.
 77. Keene, W. E.; McAnulty, J. M.; Hoesly, F. C.; Williams, L. P.; Hedberg, K.; Oxman, G. L.; Barrett, T. J.; Pfaller, M. A. & Fleming, D. W.: A Swimming-Associated Outbreak of Hemorrhagic Colitis Caused by *Escherichia coli* O157:H7 and *Shigella* Sonnei. *New England Journal of Medicine* 1994, 331(9):579-584.
 78. Kehl, K. S.; Havens, P.; Behnke, C. E. & Acheson, D. W.: Evaluation of the premier EHEC assay for detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology* 1997, 35(8):2051-2054.
 79. Keller, R.; Hilton, T. D.; Rios, H.; Boedeker, E. C. & Kaper, J. B.: Development of a live oral attaching and effacing *Escherichia coli* vaccine candidate using *Vibrio cholerae* CVD 103-HgR as antigen vector. *Microbial Pathogenesis* 2010, 48(1):1-8.
 80. Kibel, M. A. & Barnard, P. J.: The hemolytic-uremic syndrome: a survey in Southern Africa. *South African Medical Journal* 1968, 42(27):692-698.
 81. Knutton, S.; Baldwin, T.; Williams, P. H. & McNeish, A. S.: Actin accumulation at sites of bacterial adhesion to tissue culture cells: basis of a new diagnostic test for enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* 1989, 57(4):1290-1298.
 82. Konadu, E.; Robbins, J. B.; Shiloach, J.; Bryla, D. A. & Szu, S. C.: Preparation, characterization, and immunological properties in mice of *Escherichia coli* O157 O-specific polysaccharide-protein conjugate vaccines. *Infection and Immunity* 1994, 62(11):5048-5054.

-
83. Konowalchuk, J.; Speirs, J. I. & Stavric, S.: Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* 1977, 18(3):775-779.
 84. Kurioka, T.; Yunou, Y.; Harada, H. & Kita, E.: Efficacy of Antibiotic Therapy for Infection with Shiga-Like Toxin-Producing *Escherichia coli* O157:H7 in Mice with Protein-Calorie Malnutrition. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 1999, 18(8):561-571.
 85. Levine, M. M.: *Escherichia coli* that Cause Diarrhea: Enterotoxigenic, Enteropathogenic, Enteroinvasive, Enterohemorrhagic, and Enteroadherent. *Journal of Infectious Diseases* 1987, 155(3):377-389.
 86. Levine, M. M. & Edelman, R.: Enteropathogenic *Escherichia coli* of Classic Serotypes Associated with Infant Diarrhea: Epidemiology and Pathogenesis. *Epidemiologic Reviews* 1984, 6(1):31-51.
 87. Levine, M. M.; Xu, J. G.; Kaper, J. B.; Lior, H.; Prado, V.; Tall, B.; Nataro, J.; Karch, H. & Wachsmuth, K.: A DNA Probe to Identify Enterohemorrhagic *Escherichia coli* of O157:H7 and Other Serotypes That Cause Hemorrhagic Colitis and Hemolytic Uremic Syndrome. *Journal of Infectious Diseases* 1987, 156(1):175-182.
 88. Li, Z.; Bell, C.; Buret, A.; Robins-Browne, R.; Stiel, D. & O'Loughlin, E.: The effect of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 on intestinal structure and solute transport in rabbits. *Gastroenterology* 1993, 104(2):467-474.
 89. Lienemann, T.; Pitkänen, T.; Antikainen, J.; Mölsä, E.; Miettinen, I.; Haukka, K.; Vaara, M. & Siitonen, A.: Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O100:H⁻:stx2e in drinking water contaminated by waste water in Finland. *Current Microbiology* 2011, 62(4):1239-1244.
 90. Lopez, E. L.; Diaz, M.; Grinstein, S.; Devoto, S.; Mendilaharsu, F.; Murray, B. E.; Ashkenazi, S.; Rubeglio, E.; Woloj, M.; Vasquez, M.; Turco, M.; Pickering, L. K. & Cleary, T. G.: Hemolytic Uremic Syndrome and Diarrhea in Argentine Children: The Role of Shiga-like Toxins. *Journal of Infectious Diseases* 1989, 160(3):469-475.
 91. Louie, M.; Azavedo, J. C. d.; Handelsman, M. Y.; Clark, C. G.; Ally, B.; Dytoc, M.; Sherman, P. & Brunton, J.: Expression and characterization of the eaeA gene product of *Escherichia coli* serotype O157:H7. *Infection and Immunity* 1993, 61(10):4085-4092.

-
92. Louise, C. B. & Obrig, T. G.: Shiga toxin-associated hemolytic-uremic syndrome: combined cytotoxic effects of Shiga toxin, interleukin-1 beta, and tumor necrosis factor alpha on human vascular endothelial cells in vitro. *Infection and Immunity* 1991, 59(11):4173-4179.
 93. Louise, C. B. & Obrig, T. G.: Specific Interaction of *Escherichia coli* O157:H7-Derived Shiga-like Toxin II with Human Renal Endothelial Cells. *Journal of Infectious Diseases* 1995, 172(5):1397-1401.
 94. Matise, I.; Cornick, N. A.; Booher, S. L.; Moon, H. W.; Samuel, J. E. & Bosworth, B. T.: Intervention with Shiga Toxin (Stx) Antibody after Infection by Stx-Producing *Escherichia coli*. *The Journal of Infectious Diseases* 2001, 183(2):347.
 95. McCarthy, M.: E coli O157:H7 outbreak in USA traced to apple juice. *The Lancet* 1996, 348(9037):1299.
 96. McKee, M. L.; Melton-Celsa, A. R.; Moxley, R. A.; Francis, D. H. & O'Brien, A. D.: Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 requires intimin to colonize the gnotobiotic pig intestine and to adhere to HEp-2 cells. *Infection and Immunity* 1995, 83(9):3739-3744.
 97. McKee, M. L. & O'Brien, A. D.: Investigation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 adherence characteristics and invasion potential reveals a new attachment pattern shared by intestinal E. coli. *Infection and Immunity* 1995, 63(5):2070-2074.
 98. Melton-Celsa, A. R.; Darnell, S. C. & O'Brien, A. D.: Activation of Shiga-like toxins by mouse and human intestinal mucus correlates with virulence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O91:H21 isolates in orally infected, streptomycin-treated mice. *Infection and Immunity* 1996, 64(5):1569-1576.
 99. Miller, W. T.; Poto, D. W.; Scholl, H. W. & Raffensperger, E. C.: Evanescent colitis in the young adult: a new entity? *Radiology* 1971, 100(1):71-78.
 100. Mills, M. & Payne, S. M.: Genetics and regulation of heme iron transport in *Shigella dysenteriae* and detection of an analogous system in *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Bacteriology* 1995, 177(11):3004-3009.
 101. Moake, J. L.: Haemolytic-uraemic syndrome: basic science. *The Lancet* 1994, 343(8894):393-397.

-
102. Moore, M. A.; Blaser, M. J.; Perez-Perez, G. I. & O'Brien, A. D.: Production of a Shiga-like cytotoxin by *Campylobacter*. *Microbial Pathogenesis* 1988, 4(6):455-462.
 103. Nataro, J. P. & Kaper, J. B.: Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews* 1998, 11(2):142-201.
 104. O'Brien, A.; Chen, M.; Holmes, R.; Kaper, J. & Levine, M.: Environmental and Human Isolates of *Vibrio cholerae* and *Vibrio parahaemolyticus* Produce a *Shigella dysenteriae* 1 (Shiga)-Like Cytotoxin. *The Lancet* 1984, 323(8368):77-78.
 105. O'Brien, A.; Lively, T.; Chen, M.; Rothman, S. & Formal, S.: *Escherichia coli* O157:H7 Strains Associated With Haemorrhagic Colitis in the United States Produce a *Shigella dysenteriae* 1 (Shiga) Like Cytotoxin. *The Lancet* 1983, 321(8326):702.
 106. O'Brien, A. D. & Holmes, R. K.: Shiga and Shiga-like toxins. *Microbiological Reviews* 1987, 51(2):206-220.
 107. O'Brien, A. D.; LaVeck, G. D.; Thompson, M. R. & Formal, S. B.: Production of *Shigella dysenteriae* type 1-like cytotoxin by *Escherichia coli*. *Journal of Infectious Diseases* 1982, 148(6):763-769.
 108. O'Brien, A. D.; Newland, J. W.; Miller, S. F.; Holmes, R. K.; Smith, H. W. & Formal, S. B.: Shiga-like toxin-converting phages from *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis or infantile diarrhea. *Science* 1984, 226(4675):694-696.
 109. O'Brien, A. D.; Tesh, V. L.; Donohue-Rolfe, A.; Jackson, M. P.; Olsnes, S.; Sandvig, K.; Lindberg, A. A. & Keusch, G. T.: Shiga toxin: biochemistry, genetics, mode of action, and role in pathogenesis. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 1992, 180(65-94).
 110. Oelschlaeger, T. A.; Barrett, T. J. & Kopecko, D. J.: Some structures and processes of human epithelial cells involved in uptake of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 strains. *Infection and Immunity* 1994, 62(11):5142-5150.
 111. Ojeda, A.; Prado, V.; Martinez, J.; Arellano, C.; Borczyk, A.; Johnson, W.; Lior, H. & Levine, M. M.: Sorbitol-negative phenotype among enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains of different serotypes and from different sources. *Journal of Clinical Microbiology* 1995, 33(8):2199-2201.
 112. Okayama, A.; Mikasa, K.; Matsui, N.; Higashi, N.; Miyamoto, M. & Kita, E.: An Interventional Approach to Block Brain Damage Caused by Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Infection, by

Use of a Combination of Phosphodiesterase Inhibitors. The Journal of Infectious Diseases 2004, 190(12):2129-2136.

113. Pacheco, A. R. & Sperandio, V.: Shiga toxin in enterohemorrhagic *E. coli*: regulation and novel anti-virulence strategies. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology 2012, 2(Article 81).
114. Paton, A. W. & Paton, J. C.: Enterobacter cloacae producing a Shiga-like toxin II-related cytotoxin associated with a case of hemolytic-uremic syndrome. Journal of Clinical Microbiology 1996, 34(2):463-465.
115. Paton, J. & Paton, A.: Pathogenesis and Diagnosis of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* infections. Clinical Microbiology Reviews 1998, 11(3):450-479.
116. Pavia, A. T.; Nichols, C. R.; Green, D. P.; Tauxe, R. V.; Mottice, S.; Greene, K. D.; Wells, J. G.; Siegler, R. L.; Brewer, E. D. & Hannon, D.: Hemolytic-uremic syndrome during an outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections in institutions for mentally retarded persons: clinical and epidemiologic observations. The Journal of Pediatrics 1990, 116(4):544-551.
117. Pickering, L. K.; Obrig, T. G. & Stapleton, F. B.: Hemolytic-uremic syndrome and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. The Pediatric Infectious Disease Journal 1994, 13(6):459-475.
118. Piérard, D.; Etterijck, R. V.; Breynaert, J.; Moriau, L. & Lauwers, S.: Results of screening for verocytotoxin-producing *Escherichia coli* in faeces in Belgium. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases 1990, 9(3):198-201.
119. Pierard, D.; Huyghens, L.; Lauwers, S. & Lior, H.: Diarrhoea associated with *Escherichia coli* producing porcine oedema disease verotoxin. The Lancet 1991, 338(8769):762.
120. Prado, J. V. & Cavagnaro, S. M. F.: Síndrome hemolítico urémico asociado a infección intestinal por *Escherichia coli* productora de shigatoxina (STEC) en pacientes chilenos: aspectos clínicos y epidemiológicos. Revista Chilena de Infectología 2008, 25(6):435-444.
121. Proulx, F.; Seidman, E. G. & Karpman, D.: Pathogenesis of Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome. Pediatric Research 2001, 50(2):163-171.
122. Proulx, F. o.; Turgeon, J. P.; Delage, G.; Lafleur, L. & Chicoine, L.: Randomized, controlled trial of antibiotic therapy for *Escherichia coli* O157:H7 enteritis. The Journal Of Pediatrics 1992, 121(2):299-303.

-
123. Rangel, J. M.; Sparling, P. H.; Crowe, C.; Griffin, P. M. & Swerdlow, D. L.: Epidemiology of *Escherichia coli* O157: H7 outbreaks, United States, 1982–2002. *Emerging Infectious Diseases* 2005, 11(4):603-609.
 124. Richardson, S. E.; Rotman, T. A.; Jay, V.; Smith, C. R.; Becker, L. E.; Petric, M.; Olivieri, N. F. & Karmali, M. A.: Experimental verocytotoxemia in rabbits. *Infection and Immunity* 1992, 60(10):4154-4167.
 125. Ridell, J.; Siitonen, A.; Paulin, L.; Lindroos, O.; Korkeala, H. & Albert, M. J.: Characterization of *Hafnia alvei* by biochemical tests, random amplified polymorphic DNA PCR, and partial sequencing of 16S rRNA gene. *Journal of Clinical Microbiology* 1995, 33(9):2372-2376.
 126. Riley, L. W.; Remis, R. S.; Helgerson, S. D.; McGee, H. B.; Wells, J. G.; Davis, B. R.; Hebert, R. J.; Olcott, E. S.; Johnson, L. M.; Hargrett, N. T.; Blake, P. A. & Cohen, M. L.: Hemorrhagic Colitis Associated with a Rare *Escherichia coli* Serotype. *New England Journal of Medicine* 1983, 308(12):681-685.
 127. Ritchie, J. M.; Thorpe, C. M.; Rogers, A. B. & Waldor, M. K.: Critical roles for stx2, eae, and tir in enterohemorrhagic *Escherichia coli*-induced diarrhea and intestinal inflammation in infant rabbits. *Infection and Immunity* 2003, 71(12):7129-7139.
 128. Sandvig, K. & van Deurs, B.: Endocytosis and intracellular sorting of ricin and Shiga toxin. *FEBS Letters* 1994, 346(1):99-102.
 129. Savarino, S. J.; McVeigh, A.; Watson, J.; Cravioto, A.; Molina, J.; Echeverria, P.; Bhan, M. K.; Levine, M. M. & Fasano, A.: Enteroaggregative *Escherichia coli* Heat-Stable Enterotoxin Is Not Restricted to Enteroaggregative *E. coli*. *Journal of Infectious Diseases* 1996, 173(4):1019-1022.
 130. Scotland, S. M.; Smith, H. R.; Willshaw, G. A. & Rowe, B.: Vero Cytotoxin Production in Strains of *Scherichia coli* is determined by Genes Carried on Bacteriophage. *The Lancet* 1983, 322(8343):216.
 131. Schauer, D. B. & Falkow, S.: Attaching and effacing locus of a *Citrobacter freundii* biotype that causes transmissible murine colonic hyperplasia. *Infection and Immunity* 1993, 61(6):2486-2492.
 132. Schmidt, H.; Beutin, L. & Karch, H.: Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933. *Infection and Immunity* 1995, 66(3):1055-1061.

-
133. Schmidt, H. & Karch, H.: Enterohemolytic phenotypes and genotypes of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O111 strains from patients with diarrhea and hemolytic-uremic syndrome. *Journal of Clinical Microbiology* 1996, 34(10):2364-2367.
 134. Schmidt, H.; Montag, M.; Bockemühl, J.; Heesemann, J. & Karch, H.: Shiga-like toxin II-related cytotoxins in *Citrobacter freundii* strains from humans and beef samples. *Infection and Immunity* 1993, 61(2):534-543.
 135. Sherman, P.; Cockerill, F.; Soni, R. & Brunton, J.: Outer membranes are competitive inhibitors of *Escherichia coli* O157:H7 adherence to epithelial cells. *Infection and Immunity* 1991, 59(3):890-899.
 136. Siegler, R. L.; Griffin, P. M.; Barrett, T. J. & Strockbine, N. A.: Recurrent hemolytic uremic syndrome secondary to *Escherichia coli* O157:H7 infection. *Pediatrics* 1993, 91(3):666-668.
 137. Sjogren, R.; Neill, R.; Rachmilewitz, D.; Fritz, D.; Newland, J.; Sharpnack, D.; Colleton, C.; Fondacaro, J.; P, P. G. & Boedeker, E.: Role of Shiga-like toxin I in bacterial enteritis: comparison between isogenic *Escherichia coli* strains induced in rabbits. *Gastroenterology* 1994, 106(2):306-317.
 138. Smith, H. W.; Green, P. & Parsell, Z.: Vero Cell Toxins in *Escherichia coli* and Related Bacteria: Transfer by Phage and Conjugation and Toxic Action in Laboratory Animals, Chickens and Pigs. *Journal of General Microbiology* 1983, 129(10):3121-3137.
 139. Stroehler, U. H.; Bode, L.; Beutin, L. & Manning, P. A.: Characterization and sequence of a 33-kDa enterohemolysin (Ehly1)-associated protein in *Escherichia coli*. *Gene* 1993, 132(1):89-94.
 140. Su, C. & Brandt, L. J.: *Escherichia coli* O157: H7 Infection in Humans. *Annals of Internal Medicine* 1995, 123(9):698-707.
 141. Swinbanks, D.: Blood scandal and *E. coli* raise questions in Japan. *Nature* 1997, 385(6611):9.
 142. Sylvie, P.; Françoise, D.; Joël, G. & Patrick, F.: Detection by 5'-nuclease PCR of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* O26, O55, O91, O103, O111, O113, O145 and O157:H7, associated with the world's most frequent clinical cases. *Molecular and Cellular Probes* 2004, 18(3):185-192.

-
143. Tarr, P. I.: *Escherichia coli* O157:H7: Clinical, Diagnostic, and Epidemiological Aspects of Human Infection. *Clinical Infectious Diseases* 1995, 20(1):1-10.
 144. Tarr, P. I.; Bilge, S. S.; Vary, J. C.; Jelacic, S.; Habeeb, R. L.; Ward, T. R.; Baylor, M. R. & Besser, T. E.: Iha: a novel *Escherichia coli* O157:H7 adherence-conferring molecule encoded on a recently acquired chromosomal island of conserved structure. *Infection and Immunity* 2000, 68(3):1400-1407.
 145. Tarr, P. I.; Fouser, L. S.; Stapleton, A. E.; Wilson, R. A.; Kim, H. H.; Vary, J. C. & Clausen, C. R.: Hemolytic-Uremic Syndrome in a Six-Year-Old Girl after a Urinary Tract Infection with Shiga-Toxin-Producing *Escherichia coli* O103:H2. *New England Journal of Medicine* 1996, 335(9):635-638.
 146. Tarr, P. I.; Neill, M. A.; Clausen, C. R.; Watkins, S. L.; Christie, D. L. & Hickman, R. O.: *Escherichia coli* O157:H7 and the Hemolytic Uremic Syndrome: Importance of Early Cultures in Establishing the Etiology. *Journal of Infectious Diseases* 1990, 162(2):553-556.
 147. Tesh, V. L.; Ramegowda, B. & Samuel, J. E.: Purified Shiga-like toxins induce expression of proinflammatory cytokines from murine peritoneal macrophages. *Infection and Immunity* 1994, 62(11):5085-5094.
 148. Thomas, A.; Cheasty, T.; Chart, H. & B, B. R.: Isolation of vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* serotypes O9ab:H- and O101:H-carrying VT2 variant gene sequences from a patient with haemolytic uraemic syndrome. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 1994, 13(12):1074-1076.
 149. Thompson, J. S.; Hodge, D. S. & Borczyk, A. A.: Rapid biochemical test to identify verocytotoxin-positive strains of *Escherichia coli* serotype O157. *Journal of Clinical Microbiology* 1990, 28(10):2165-2168.
 150. Tison, D. L.: Culture confirmation of *Escherichia coli* serotype O157:H7 by direct immunofluorescence. *Journal of Clinical Microbiology* 1990, 28(3):612-613.
 151. Tobias, J. & Vutukuru, S.-R.: Simple and rapid multiplex PCR for identification of the main human diarrheagenic *Escherichia coli*. *Microbiological Research* 2012, 167(9):564-570.
 152. Torres, A. G. & Payne, S. M.: Haem iron-transport system in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Molecular Microbiology* 1997, 23(4):825-833.

-
153. Tzipori, S.; Gunzer, F.; Donnenberg, M. S.; de-Montigny, L.; Kaper, J. B. & Donohue-Rolfe, A.: The role of the *eaeA* gene in diarrhea and neurological complications in a gnotobiotic piglet model of enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection. *Infection and Immunity* 1995, 63(9):3621-3627.
 154. Tzipori, S.; Karch, H.; Wachsmuth, K. I.; Robins-Browne, R. M.; O'Brien, A. D.; Lior, H.; Cohen, M. L.; Smithers, J. & Levine, M. M.: Role of a 60-megadalton plasmid and Shiga-like toxins in the pathogenesis of infection caused by enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in gnotobiotic piglets. *Infection and Immunity* 1987, 55(12):3117-3125.
 155. Vally, H.; Hall, G.; Dyda, A.; Raupach, J.; Knope, K.; Combs, B. & Desmarchelier, P.: Epidemiology of Shiga toxin producing *Escherichia coli* in Australia, 2000-2010. *BMC Public Health* 2012, 12(1):63-63.
 156. van de Kar, N. C.; Monnens, L. A.; Karmali, M. A. & van Hinsbergh, V. W.: Tumor necrosis factor and interleukin-1 induce expression of the verocytotoxin receptor globotriaosylceramide on human endothelial cells: implications for the pathogenesis of the hemolytic uremic syndrome. *Blood* 1992, 80(11):2755-2764.
 157. van de Kar, N. C.; Sauerwein, R. W.; Demacker, P. N.; Grau, G. E.; Hinsbergh, V. W. v. & Monnens, L. A.: Plasma cytokine levels in hemolytic uremic syndrome. *Nephron* 1995, 71(3):309-313.
 158. Willis, M. F.; Karen, C. J.; Ken, J. Y.; Ruben, Z. & Stephen, D. W.: Efficacy of a post enrichment acid treatment for isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from alfalfa sprouts. *Food Microbiology* 2012, 30(1):83-90.
 159. Willshaw, G. A.; Scotland, S. M.; Smith, H. R. & Rowe, B.: Properties of Vero Cytotoxin-Producing *Escherichia coli* of Human Origin of O Serogroups Other than O157. *Journal of Infectious Diseases* 1992, 166(4):797-802.
 160. Wong, C. S.; Mooney, J. C.; Brandt, J. R.; Staples, A. O.; Jelacic, S.; Boster, D. R.; Watkins, S. L. & Tarr, P. I.: Risk Factors for the Hemolytic Uremic Syndrome in Children Infected With *Escherichia coli* O157:H7: A Multivariable Analysis. *Clinical Infectious Diseases* 2012, 55(1):33-41.
 161. Yamamoto, T.; Kojio, S.; Taneike, I.; Nakagawa, S.; Iwakura, N. & Wakisaka-Saito, N.: 60Co irradiation of Shiga toxin (Stx)-producing *Escherichia coli* induces Stx phage. *FEMS Microbiology Letters* 2003, 222(1):115-121.

-
162. Yu, J. & Kaper, J. B.: Cloning and characterization of the *eae* gene of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Molecular Microbiology* 1992, 6(3):411-417.
 163. Zadik, P. M.; Chapman, P. A. & Siddons, C. A.: Use of tellurite for the selection of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157. *Journal of Medical Microbiology* 1993, 39(2):155-158.