

Detección molecular de *Escherichia coli* productor de shiga toxina (*Stx1*) y rotavirus en heces de niños con diarrea.

Luz B. Villalobos de B., Rosa E. Martínez, Alberto C. Blanco, Antonio J. Maldonado
Jesús W. Bastardo.

Grupo de Gastroenteritis Infecciosa. Postgrado en Biología Aplicada,
Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre, Cumaná, Venezuela.

Palabras clave: *Escherichia coli*, shiga toxinas, rotavirus, diarrea, niños.

Resumen. Se investigó la presencia de *E. coli* productora de shiga toxina y rotavirus en heces de 90 niños diarreicos con edades comprendidas entre 0 y 3 años. De cada muestra se tomaron tres alícuotas: una se sometió a enriquecimiento previo para *E. coli* O157, con otra se hizo siembra directa en placas con agar MacConkey-Sorbitol y Rojo Eosina con MUG y la última se congeló a -70°C para el análisis posterior de rotavirus. La búsqueda de *E. coli* O157 se realizó por inmunocromatografía *in vitro* de Coris Bioconcept (Bélgica) y O157:H7 por serología con antisueros FUVESIN. La presencia del antígeno O157 (rbfO157) y de los genes que codifican para las shiga toxinas (*stx1* y *stx2*) se determinó por PCR. Los rotavirus se detectaron por electroforesis en geles de poliacrilamida. Las 90 muestras de heces analizadas resultaron negativas para el antígeno O157 y para O157:H7. La PCR corroboró que 9 cepas sospechosas aisladas de los medios de cultivos, eran cepas STEC no O157 y portadoras del gen *stx1*, mostrando un 10% de positividad. La electroforesis para el ARN viral detectó rotavirus en 21 (23,33%) muestras. Se confirma el predominio de rotavirus y se sugiere que la circulación de cepas STEC no O157, es un indicio de la participación de estas cepas en la etiología de las diarreas agudas.

Molecular detection of shiga toxin-producing (stx1) *Escherichia coli* and rotavirus in stools of children with diarrhea.

Invest Clin 2008; 49(3): 387 - 395

Key words: *Escherichia coli*, shiga toxin, rotavirus, diarrheas, children.

Abstract. The presence of *E. coli* producer of shiga toxin and rotavirus was investigated in 90 stool samples from children less than 3 years old with diarrhea. Three aliquots were separated from each sample: the first one underwent previous enrichment for *E. coli* O157, the second one was plated on agar MacConkey-Sorbitol and Red Eosine with MUG, and the last one was frozen at -70°C for the later analysis of rotavirus. The search of the antigen O157 of *E. coli* was carried out by immunochromatography *in vitro* of Coris Bioconcept (Belgium). The presence of the antigen O157 (rbf O157) and the genes that code for the shiga toxin (*stx1* y *stx2*) were determined by PCR. Rotavirus were detected by electrophoresis in polyacrylamide gels. The 90 samples analyzed by immunochromatography were negative for the antigen O157. The isolates were STEC strains non O157 and contained the gene *stx1*, showing a 10% of positivity. The electrophoresis for the viral RNA detected rotavirus in 21 (23.33%) samples. This result confirms the rotavirus prevalence and suggests, that the circulation of STEC strains non O157 is an indication of the involvement of these strains in the ethiology of acute diarrheas.

Recibido: 15-05-2007. Aceptado: 17-01-2008.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades diarreicas son una de las causas más comunes de morbilidad y mortalidad que afecta principalmente a la población infantil (1). A razón de factores socioeconómicos y nutricionales, la probabilidad de que un niño muera por enfermedad diarreica antes de los 7 años, puede llegar al 50% (2).

Con respecto a la etiología bacteriana, *Escherichia coli* como flora habitual del intestino, representa uno de los microorganismos de importancia en el humano, debido a que agrupa diversas cepas que causan padecimientos extraintestinales y a otras que se destacan entre los principales agentes etiológicos del síndrome diarreico (3).

La *Escherichia coli* productora de shiga toxina (STEC) ha emergido como un patógeno entérico de origen zoonótico, de considerable importancia en la salud pública tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo. El rango de manifestaciones clínicas debidas a la infección por cepas STEC, varía desde una infección asintomática, diarrea acuosa, hasta enfermedad severa con diarrea sanguinolenta o colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico (SUH) (4).

Entre los serotipos de *E. coli* que pertenecen al grupo STEC, el serotipo enterohemorrágico O157:H7 ha sido el que ha recibido mayor atención debido a su especial virulencia que se ve reflejada por el elevado número de afectados en cada uno de los brotes (5).

Las cepas STEC de origen humano, animal o de alimentos, pueden producir una o más citotoxinas que forman parte de la familia de las toxinas shiga (*stxs*). Estas citotoxinas (*stx1* y *stx2*), son el principal mecanismo de patogenicidad de *E. coli* enterohemorrágica O157:H7 junto con otros factores de virulencia (6). Sin embargo, otros 200 serotipos STEC no-O157 también han sido identificados como productores de estas toxinas, en forma conjunta o separada (*stx1* y/o *stx2*) y han estado involucrados en enfermedades diarreicas en humanos (7-11). Son capaces de causar brotes o casos aislados y en ocasiones no se logra establecer la fuente de contaminación, aunque se sabe que se pueden aislar de las mismas fuentes que las cepas del serotipo O157:H7 (12).

El consumo de alimentos contaminados, el contacto directo e indirecto con animales y la transmisión persona a persona, han sido señalados como las vías más importantes de transmisión de STEC (13). Esta última vía de infección ha sido documentada en jardines maternos y de infantes y en centros de asistencia a enfermos mentales (14).

Las STEC se encuentran ampliamente distribuidas en el mundo, y aunque muchos casos esporádicos y brotes de colitis hemorrágica han sido reportados en naciones industrializadas, las infecciones humanas asociadas con cepas STEC de *E. coli*, también han sido descritas en algunos países de Latinoamérica incluyendo Chile, Brasil y Argentina (15).

Argentina se ubica como uno de los países con frecuencias de detección de STEC O157 y no-O157 cercanos al 30%. En este país, el SUH es endémico y constituye la primera causa pediátrica de insuficiencia renal aguda y la segunda de insuficiencia renal crónica; además, es responsable del 20% de los trasplantes renales en niños y adolescentes (16).

En Venezuela, la data sobre los cuadros de diarrea aguda ubican a los rotavirus del grupo A como la principal causa de diarrea en niños menores de 5 años y responsable del 33% de los episodios de diarreas que requieren hospitalización y del 23% de las diarreas que requieren tratamiento médico (17,18). Si bien los rotavirus son de vital consideración a la hora de evaluar heces diarreicas, es conveniente la identificación de otros agentes etiológicos como la *E. coli* productora de shiga toxinas (STEC), que pueden ser responsable de cuadros de diarrea aguda en la población infantil venezolana.

Cabe destacar que en nuestro país solo se ha descrito la presencia de STEC O157 en muestras de alimentos (19) y en heces de ganado bovino (20). Sin embargo, la incidencia de las STEC no-O157 no ha sido documentada, motivo por el cual se llevó a cabo el presente estudio cuyo objetivo principal fue la de evaluar la posible intervención de cepas STEC no-O157 en heces diarreicas de niños que acudieron a la emergencia de un centro ambulatorio de la ciudad de Cumaná, Venezuela.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras

El estudio incluyó una población de 90 niños con edades comprendidas entre 0 y 3 años que acudieron al ambulatorio "Arquímedes Fuentes Serrano" de la ciudad de Cumaná, Venezuela, en el período comprendido entre mayo y septiembre de 2004. Los criterios de inclusión en el estudio fueron: ser diarreicos y no haber recibido algún tratamiento previo con antibióticos. En el momento de la recolección de las muestras, se solicitó el consentimiento informado de los padres, para que la misma formara parte del estudio y luego se tomaron los datos del niño. Una vez recolectadas las muestras fecales, estas fueron refrigeradas y transportadas al laboratorio para su análisis.

Procesamiento de las muestras

De cada una de las muestras de heces se tomaron tres alícuotas. La primera para llevar a cabo un enriquecimiento previo para *E. coli* O157:H7, en 10 mL de caldo tripticasa de soya suplementado con novobiocina (20 mg/L) a 37°C por 8 horas. La segunda porción, fue sembrada de forma directa en placas que contenían agar MacConkey-Sorbitol y Rojo Eosina con MUG, para la detección de actividad de Beta-D-glucoronidasa y fermentación de sorbitol (21) a 37°C por 24 horas. La tercera se congeló (-70°C).

Detección del antígeno O157 por inmunocromatografía

Para la detección de *E. coli* O157:H7 en las heces se realizó el ensayo de inmunocromatografía *in vitro* Coris Bioconcept (Science Park Crealys- Bélgica). Esta es una prueba de uso rápido cuya especificidad es medida por un anticuerpo monoclonal específico para lipolisacáridos de *E. coli* O157:H7, conjugados con partículas de oro coloidal y unido a una membrana de nitrocelulosa.

Siguiendo las indicaciones del fabricante, del caldo tripticasa de soya suplementado con novobiocina, se tomaron 0,25 mL y se colocaron en tubo de ensayo pequeño junto con 0,25 mL del buffer de dilución que trae el estuche. Se mezcló para homogeneizar la solución y se colocó la tira sensibilizada en la dirección que indicaba la flecha.

Después de 15 min se leyeron los resultados, los cuales se interpretaron del siguiente modo: la formación de una línea se consideró negativo, dos líneas como positivo y ninguna como inválido.

Serología

Este ensayo fue necesario para descartar la posible presencia de cepas pertenecientes al serogrupo enterohemorrágico

O157:H7 y estar seguros de los resultados hallados por inmunocromatografía.

La caracterización serológica se llevó a cabo mediante la técnica de aglutinación en lámina con antiseros polivalentes elaborados por la Fundación Venezolana para el Estudio de la Salud Infantil (FUVESIN) (22). El antisuero utilizado estuvo conformado con anticuerpos específicos para el serogrupo enterohemorrágico (O157:H7) de *E. coli*. Para la prueba, se tomaron en consideración todas aquellas colonias sospechosas que desarrollaron en los medios MacConkey-Sorbitol y Rojo Eosina con MUG.

Identificación por PCR del gen que codifica para el antígeno O157 (*rfbO157*) y el gen que codifica la expresión de las shigas toxinas (*stx1* y *stx2*)

De las placas con agar MacConkey-Sorbitol se aislaron de 5 a 10 colonias características de *E. coli* para la extracción del ADN. Esta se llevó a cabo siguiendo las pautas de Leotta y col. (16). En resumen: con las cepas aisladas se procedió a la preparación de una suspensión bacteriana en un caldo LB (Luria Bertani). Se centrifugó a 10.000 rpm por 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y se le agregó a cada tubo 150 μ L de solución de triton X-100 al 1% en buffer TE 1X. Luego se hirvió durante 15 minutos. Se centrifugó nuevamente a 10.000 rpm por 5 minutos. Se conservó el sobrenadante, el cual fue utilizado como blanco en la técnica de PCR. Una vez extraído el ADN, se procedió a realizar un ensayo de PCR multiplex utilizando 3 pares de oligonucleótidos iniciadores para amplificar un fragmento de los genes *rfbO157*, *stx1* y *stx2*.

Se utilizó un volumen final de 50 μ L de la mezcla de reacción de PCR que contiene 5 μ L de buffer PCR 10X, 2 μ L de dinucleótidos (dNTPs), 1,5 μ L de Cl_2Mg (Invitrogen Life Tecnologías; Brasil), 0,2 μ L del oli-

gonucleótido *rfb0157*, 1 μ L de los oligonucleótidos *stx1* y *stx2*, cuyas secuencias se reflejan en la Tabla I, 0,2 μ L de taq polimerasa, 36,9 μ L de agua para PCR y 2 μ L de ADN molde.

Como control positivo, se utilizó el ADN molde de la cepa 417 (*E. coli* O157:H7 productora de shiga toxina I y II) certificada por el Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos (23). Como control negativo se utilizó mezcla de reacción de PCR sin ADN templado.

Las condiciones de amplificación fueron 94°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos a 94°C por 30 seg, 58°C por 30 seg y 72°C por 2 minutos. Los productos amplificados fueron corridos en un gel de agarosa 2% a 8 voltios por 50 min. Las bandas fueron visualizadas en un transluminador de luz UV, con tinción de bromuro de etidio.

Detección de rotavirus tipo A

Se procedió hacer una evaluación adicional para determinar la participación activa o la posible interacción de otros patógenos entéricos. Dicha evaluación consistió en determinar la presencia de rotavirus del grupo A, por ser éste uno de los principales agentes causales de la enfermedad diarreaica aguda en nuestro país.

Para el momento de la realización de este estudio, nuestro laboratorio solo contaba con la técnica de PAGE (electroforesis

en gel de poliacrilamida), con el cual procedimos a llevar a cabo el ensayo.

Las muestras fecales mantenidas a -70°C, se descongelaron y se diluyeron en una proporción 1:4 en buffer de acetato de sodio 0,1 M (pH 5.0) que contenía SDS al 1% (p/v). Luego se les añadió un volumen igual de una mezcla de fenol-cloroformo 3:2 (v/v) y se agitó vigorosamente por 3 min. La emulsión resultante se centrifugó por 20 min y al sobrenadante se le adicionó etanol frío para precipitar el ácido nucleico durante toda la noche (24). Luego se centrifugó a 14.000 r.p.m por 15 minutos y al sedimento resultante se le añadió 40 μ L de buffer de disociación (Tris-HCl 1 M pH 7,8; 20% de SDS; 0,1% azul de bromofenol y 25% de glicerol), se calentó en baño de maría a 65°C aproximadamente por 4 min para su resuspensión antes de colocarse en los pozos del gel espaciador para la corrida electroforética.

La electroforesis se realizó en geles planos de poliacrilamida, siguiendo el procedimiento descrito por Laemli (25) pero omitiendo el SDS en todos los buffers. La corrida se llevó a cabo a temperatura ambiente con una corriente constante de 30 mA y a un voltaje inicial de aproximadamente 60V, durante 14 horas. Una vez completada la corrida, se desmontó el gel y se procedió a la tinción con nitrato de plata (26).

TABLA I
SECUENCIAS DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS INICIADORES EN LA TÉCNICA DE PCR PARA LA DETECCIÓN DEL ANTÍGENO 0157 (*rfb0157*) Y EL GEN QUE CODIFICA LA EXPRESIÓN DE LA SHIGAS TOXINAS (*stx1* y *stx2*)

Primer	Secuencias de los oligonucleótidos (5'-3')	Tamaño de la banda esperada
O157a	CGGACATCC ATGTGATATGG	259 pb
O157b	TTGCCTATGTACAGCTAATCC	
Stx1 a	GAAGAGTCCGTGGGATTACG	130 pb
Stx1b	AGCGATGCAGCTATTAATAA	
Stx2a	TTAACCACACCCCACCGGGCAGT	346 pb
Stx2b	GCTCTGGATGCATCTCTGGT	

RESULTADOS

Las noventa muestras de heces diarreas analizadas por inmunocromatografía (Coris Bioconcept-Bélgica) fueron negativas para el antígeno O157 de *E. coli*, aun cuando 9 (10%) cepas habían mostrado características particulares de *E. coli* O157:H7 (sorbitol y MUG negativas) en los medios selectivos usados en el estudio.

Para confirmar los resultados obtenidos por inmunocromatografía y estar seguros de que las 9 cepas sospechosas aisladas a partir de los medios de cultivos no son STEC de tipo enterohemorrágico se realizó un ensayo con antisuero específico para identificar el serotipo O157:H7. Los resultados fueron negativos, debido que ninguna de las cepas aglutinó con el antisuero.

Posterior a la detección por inmunocromatografía y prueba de aglutinación con antisuero, un PCR multiplex fue llevado a cabo usando oligonucleótidos iniciadores de los genes *stx1*, *stx2* y O157. En el ensayo de PCR (Fig. 1), las 9 cepas aisladas no poseían los genes que codifican para el sero-

grupo O157 y la producción de *stx2*, pero si contaban con genes para la producción de *stx1* (130 pb), poniendo en evidencia la presencia de cepas de *E. coli* STEC no O157, productora de shiga toxina *stx1*.

La mayor positividad de cepas productoras de shiga toxina (*stx1*) de *E. coli*, se observó en niños mayores de 24 meses de edad (Tabla II).

Adicional a la identificación de cepas STEC no O157, el estudio reveló un porcentaje relativamente alto (23,33%) de rotavirus en muestras de heces diarreas que resultaron negativas para *E. coli* STEC, específicamente las procedentes de niños incluidos en el grupo etario de 0-12 meses (38,88%) (Tabla II). No se observó interacción de rotavirus y *E. coli* productor de (*stx1*), por cuanto ambas etiologías no estuvieron presentes en un mismo paciente.

DISCUSIÓN

Los resultados hallados por inmunocromatografía y serología, sugieren la no participación de cepas STEC del tipo ente-



Fig. 1. Amplificación por PCR para el gen *RFBO157*, STX (2) y STX(1). Pozos: (1) Marcador de Peso Molecular; (2) Cepa 10 (3); Cepa 22 (4); Cepa 32 (5); Cepa 42 (6); Cepa 45 (7); Cepa 48 (8); Cepa 50 (9); Cepa 61 (10); Cepa 74 (11) *E. coli* O157:H7 Certificada (417) Productor de STX1 y STX2 (12) Control negativo.

TABLA II
 PRESENCIA DE ROTAVIRUS HUMANOS (RVH) Y CEPAS STEC NO 0157 (STX1) COMPARADO
 CON LA EDAD DE LOS NIÑOS QUE ACUDIERON AL AMBULATORIO
 “ARQUÍMEDES FUENTES SERRANO” DE LA CIUDAD DE CUMANÁ, VENEZUELA

Edad en meses	N° total de casos	N° de casos positivos a RVH	% de casos positivos a RVH	N° de casos positivos STEC (Stx1)	% de casos positivos a STEC (Stx1)
0-12 meses	36	14	38,88%	2	6,25%
13-24 meses	23	3	13,04%	0	0
> 24 meses	31	4	12,90%	7	25,92%

rohemorrágico (O157:H7) en la etiología de los casos de diarrea analizados.

El desarrollo de la técnica de PCR corroboró lo hallado tanto por inmunocromatografía y serología, al no amplificar secuencias específicas del gen O157. No obstante, la PCR puso en evidencia la capacidad de producción de shiga toxinas del tipo *stx1* en las 9 (10%) cepas de *E. coli* aisladas, sugiriendo la intervención de STEC no-O157 capaces de producir shiga toxina del tipo 1 y en especial en niños mayores de 24 meses de edad.

El porcentaje de STEC productoras de shiga toxina 1 halladas en este estudio, coinciden con los reportados por Gomez y col. (13) en un estudio realizado en un brote de gastroenteritis en un jardín maternal de la ciudad de Mar de Plata, Argentina, donde la detección de *stx1* fue positiva y la edad media de los niños afectados fue de $23,6 \pm 13,9$ meses. De igual modo, en un estudio realizado en Brasil (27) la frecuencia de cepas STEC no-O157 varió notablemente entre los serogrupos estudiados, y los niños más afectados correspondieron al grupo etario con edades comprendidas entre 1 y 5 años.

Vidal y col. (28) en un estudio realizado en niños chilenos, lograron identificar por PCR 8 cepas STEC de pacientes con diarrea esporádica. Dos de las cepas tenían el gen *stx2* y 6 fueron no-O157 y tenían el gen *stx1*.

En la descripción de las posibles causas de contaminación con cepas STEC no-O157 de la población infantil evaluada en este estudio, hace presumir que tanto el consumo de alimentos contaminados así como el contacto de persona a persona, podrían ser las principales vías de transmisión de estas cepas, dado que las condiciones inadecuadas de higiene son señalados como uno de los principales factores de riesgo para los niños, tanto en el hogar, así como en los maternales o centros de cuidado diario. Estas vías de transmisión han sido documentadas y se ha señalado su relación con brotes por STEC (13, 14).

A igual que la *E. coli* O157, el estudio de las infecciones por STEC no-O157 con fines clínicos y epidemiológicos, tiene hoy en día gran relevancia, sobre todo en países en vías de desarrollo, donde las condiciones de saneamiento ambiental no son óptimas y el control de calidad microbiológica de los alimentos no es riguroso (29).

Sin embargo, los estudios epidemiológicos de los agentes causales de la enfermedad diarreica aguda en el mundo, suministran datos que han creado paradigmas en el conocimiento de esta enfermedad (3). Una de ellas consiste en que la enfermedad diarreica viral está presente en la población infantil en niveles más altos que las causadas por bacterias o parásitos, con un grupo de alto riesgo conformado por niños entre 6 y 24 meses de edad.

Lo anteriormente expuesto, nos hizo suponer que la baja positividad de cuadros diarreicos de origen bacteriano en niños con edades comprendidas entre los 1 y 2 años, podría ser el reflejo de un brote causado principalmente por un agente viral, posiblemente rotavirus.

La corrida electroforética en geles de poliacrilamida para la identificación de un patrón electroforético de ARN correspondiente a rotavirus, mostró que 23,33% de los niños con problemas de diarrea que acudieron a la emergencia del ambulatorio "Arquímedes Fuentes Serrano", fueron causados por rotavirus del grupo A, y que a diferencia de los niños que mostraron una infección con cepas STEC no-O157 de *E. coli*, la población infantil más afectada fue la comprendida entre 0 y 12 meses, edades que según muchos investigadores, son las consideradas como las de más alto riesgo para adquirir una enfermedad diarreica aguda causada por rotavirus (1, 26).

La alta positividad de casos diarreicos por rotavirus hallados en este estudio, por una técnica (PAGE) menos sensible que la de ELISA, sugiere que este patógeno entérico sigue siendo uno de los principales agentes causales de diarrea en nuestro país, no obstante, la circulación de cepas STEC no-O157 de *E. coli* refuerza la necesidad de realizar futuros estudios sobre la epidemiología, serología, patogénesis y rol en las diferentes formas de diarreas, dado que la heterogeneidad genética entre los subtipos de shiga toxina y otros factores de virulencia, pueden generar diferencias en la patogenicidad de diferentes poblaciones STEC en humanos.

REFERENCIAS

1. Mota F, Gutiérrez C, Villa S, Calva J, Arias C, Padilla L, Guiscafré H. Pronóstico de la diarrea por rotavirus. *Sal Púb Méx* 2001; 43(6):524-528.
2. Mattar S, Visbal J, Arrieta G. *E. coli* O157:H7 enterohemorrágico, un agente etiológico de diarrea y zoonosis en Colombia subestimado. Parte I. *MVZ-Cordova*. 2001. 6(1):15-23.
3. Gutiérrez M, Urbina D, Matiz A, Puello M, Mercado M, Parra M, Ajami N, Serrano P, Trespalcios A. Comportamiento de la diarrea causada por virus y bacterias en regiones cercanas a la zona ecuatorial. *Colom Med*. 2005; 36(Supl 3): 6-14.
4. López E, Prado V, O Ryan M, Contrini M. Shigellas and shiga toxin producing *Escherichia coli* causing bloody diarrhea in LatinAmérica. *Inf Dis Clin of North Am* 2000; 14:41-65.
5. Fratamico P, Bagi LK, Bush E, Solow B. Prevalence and characterization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Swine feces recovered in the National Animal Health Monitoring Systems Swine 2000 study. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70(12):7173-7178.
6. Burk C, Dietrich G, Acar G, Moravek M, Büllte M, Märthlbauer E. Identification and characterization of a new variant of shiga toxin 1 in *Escherichia coli* ONT:H19 of bovine origin. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 2106-2112.
7. Fiedrich A, Bielaszewska M, Zhang L, Pulz M, Kuesius T, Ammon A, Karch H. *Escherichia coli* harboring shiga toxin 2 gene variants: frequency and association with clinical symptoms. *J Inf Dis* 2002; 185:74-84.
8. Schmidt H. Shiga-toxin converting bacteriophages. *Res Microbiol* 2001; 152:687-695.
9. Terrance A, Gallagher GA, Betancourt M, Koohmaraie M. Prevalence and characterization of non-O157 shiga toxin-producing *Escherichia coli* on carcasses in commercial beef cattle processing plants. *Appl Envir Microbiol* 2002; 68(10): 4847-4852.
10. Djordjevic S, Ramachandran V, Bettelheim K, Vanselow BA, Holst P, Bailey G, Hornitzky MA. Serotypes and virulence gene profiles of shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from feces of pasture-fed and lot-fed sheep. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70(7):3910-3917.

11. **Alexandree M, Prado V.** Detection of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in food. *Expert Rev Mol Diag* 2003; 3:105-115.
12. **Bielaszewska M, Schmidt H, Liesegang A, Praeger R, Rabsch W, Tschape H, Cisek A, Janda J, Blahova K, Karch J.** Cattle can be a reservoir of sorbitol-fermenting shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H-strains and a source of human diseases. *J Clin Microbiol* 2000; 38(9):3470-3473.
13. **Gómez D, Miliwebsky E, Silva A, Deza N, Zotta C, Cotella O, Espinosa E, Chinen I, Pascua C, Rivas M.** Aislamiento de *Escherichia coli* productor de toxina shiga durante un brote de gastroenteritis en un jardín maternal de la ciudad de Mar del plata. *Rev Arg Microbiol* 2005; 37:176-181.
14. **O'Donnell J, Thornton L, McNamara E, Prendergast T, Igoe D, Cosgrove C.** Outbreak of vero cytotoxin *Escherichia coli* O157 in a child day care facility. *Commun Dis Public Health* 2002; 5:54-58.
15. **Guth B, Ramos S, Cerqueira A, Andrade J, Gomes T.** Phenotypic and genotypic characteristics of shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from children in São Paulo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002; 97(8):1085-1089.
16. **Leotta G, Chinen I, Epszteyn S, Miliwebsky E, Melamed I, Motter M, Ferrer M, Marey E, Rivas M.** Validación de una técnica de PCR multiplex para la detección de *Escherichia coli* productor de shiga toxina. *Rev Arg Microbiol* 2005; 37:1-10.
17. **Pérez-Schael I.** The impact of rotavirus disease in Venezuela. *J Inf Dis* 1999; 174:19-21.
18. **Maldonado A, Bastardo JW.** Epidemiología molecular de rotavirus humanos en Cumaná, Venezuela. *Acta Cient Venez* 1992; 43:368-372.
19. **Bravo J, Villalobos L.** *Escherichia coli* enterohemorrágica en productos cárnicos comercializados en el mercado municipal de Cumaná, Venezuela. *Rev Soc Ven Microbiol* 2002; 22(2):119-121.
20. **Claudia A, Narváez G, Carruyo M, Moreno A, Rodas G, Armando E, Thomas E, Wittum.** Aislamiento de *Escherichia coli* O157:h7 en muestras de heces de ganado bovino doble propósito del municipio Miranda, estado Zulia, Venezuela. *Rev Cient FCV-LUZ* 2007; 17(3):239-245.
21. **Wells J, Davis B, Wachsmuth L, Riley L, Remis R, Sokolow R, Morris G.** Laboratory investigation of hemorrhagic colitis outbreaks associated with a rare *Escherichia* serotype. *J Clin Microbiol* 1983; 18:512-520.
22. **Fundación Venezolana para el Estudio de la Salud Infantil (FUVESIN).** Técnica de aglutinación en lámina para el diagnóstico de *E. coli* enterohemorrágica. Instituto de Biomedicina. Caracas-Venezuela. 5 pp. 1993.
23. **Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos (CVCM).** Instituto de Biología Experimental. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela. 1996.
24. **Herring A, Inglis N, Ojhe C, Snodgrass D, Menzies J.** Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. *J Clin Microbiol* 1982; 16:473-477.
25. **Laemli U.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)*.1970; 227:680-685.
26. **Maldonado A, Bastardo J.** Epidemiología de los rotavirus humanos del grupo A en niños con diarrea aguda en Cumaná. *Saber* 1997; 9(2):62-69.
27. **Vaz T, Irino K, Kato M, Dias M, Gomes A, Medeiros M, Rocha M, Guth B.** Virulence properties and characteristics of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Sao Paulo, Brazil, from 1976 through. *J Clin Microbiol* 1999; 42(2):903-905.
28. **Vidal M, Krüger E, Durán C, Lagos R, Levine M, Prado V, Toro C, Vidal R.** Single multiplex PCR assay to identify simultaneously the six categories of diarrheagenic *Escherichia coli* associated with enteric infections. *J Clin Microbiol* 2005; 43(10):5362-5365.
29. **Reyes M, Durán CT, Prado V.** Perfil de susceptibilidad a los antimicrobianos en cepas de *E. coli* productoras de shiga toxina (STEC) aisladas de infecciones humanas y de alimentos. *Rev Méd Chile* 2004; 132:1211-1216.