

DETERMINACIÓN DE FACTORES DE VIRULENCIA ASOCIADOS A *Escherichia coli* ENTEROHEMORRÁGICA EN CEPAS PERUANAS AISLADAS ENTRE 1999-2001

José Huguet T¹, Blanca Huapaya C¹, Eduardo Salazar L²

¹ Laboratorio de Enteropatógenos, División de Bacteriología, Centro Nacional de Salud Pública, Instituto Nacional de Salud. Lima - Perú.

² Hospital Nacional Cayetano Heredia. Lima - Perú.

RESUMEN

En el presente estudio se intentó detectar la presencia del gen de toxina shiga en cepas locales de *Escherichia coli* serológicamente relacionados a la categoría enterohemorrágica, caracterizando además un aislamiento reportado como serotipo O157:H7 procedente de la ciudad de Tacna (cepa Tacna410), mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y secuenciamiento. Los resultados confirmaron la presencia del gen de la toxina shiga sólo en la cepa Tacna410, obteniéndose una identidad del 100% entre la secuencia nucleotídica del gen de la cepa Tacna410 y secuencias reportadas de la toxina shiga de tipo II en el Genebank. Asimismo, se detectó en la cepa Tacna410 propiedades hemolíticas y el gen *eae* asociado al fenómeno de "attaching and effacing", características de una típica cepa de ECEH.

Palabras clave: *Escherichia coli* O157/genética; Toxina shiga/genética; Reacción en cadena por polimerasa; Perú (fuente: BIREME).

ABSTRACT

We tried to detect the Shiga toxin gene in local *Escherichia coli* strains serologically related to the enterohemorrhagic category. At the same time, using polymerase chain reaction (PCR) and sequencing, we characterized a strain confirmed as *E. coli* O157:H7 serotype, which was isolated in Tacna (a city in southern Peru) (Tacna410 strain). Our results confirmed the presence of the Shiga toxin gene only in *E. coli* strain Tacna410, and we found 100% identity between the sequence from the amplified gene and reference sequences for Type II Shiga toxin in the gene bank. We also detected in the Tacna410 strain hemolytic properties and the *eae* gene, which is associated to "attaching and effacing" lesions, typical features of EHEC, strains.

Key words: *Escherichia coli* O157/genetics; Shiga toxin shiga/genetics; Polymerase chain reaction; Peru (source: BIREME).

INTRODUCCIÓN

La presencia de *Escherichia coli* enterohemorrágica (ECEH) como agente etiológico relacionado a diarrea con sangre en niños, ha cobrado mucha importancia en los últimos años, recomendándose en muchos laboratorios de referencia, la vigilancia epidemiológica de este patógeno¹⁻³.

ECEH se caracteriza principalmente por poseer un gen que codifica una potente toxina denominada "toxina shiga", la cual actúa inhibiendo la síntesis proteica y produciendo daño celular severo⁴⁻⁶. Además, ECEH presenta otros factores que están relacionados a la patogenicidad de la bacteria. Uno de ellos es el gen *eae* o intimina, asociado a la adherencia íntima de las bacterias a los enterocitos y destrucción de microvellosidades (fenómeno de "attaching and effacing" A/E). Otro factor de virulencia característico en ECEH es un plásmido de 60 Mda que codifica una

enterohemolisina denominado pO157⁷. Todos estos factores de virulencia presentes en la bacteria definen la categoría enterohemorrágica la cual causa un cuadro característico de diarrea severa con sangre, desencadenando en algunas ocasiones un síndrome urémico hemolítico, principalmente en niños y ancianos⁷.

En la actualidad, para la detección de ECEH se utilizan diversas metodologías. Las primeras pruebas presuntivas son las bioquímicas, demostrándose la incapacidad de muchas cepas de ECEH de fermentar el sorbitol⁸. Otra prueba utilizada es la serología, la cual se basa en la asociación de ciertos serotipos a esta categoría. El serotipo más representativo de la categoría enterohemorrágica es el O157:H7, pero existen alrededor de 50 serotipos asociados a ECEH, entre los principales destacan O26, O111 y O158⁷. Sin embargo, es importante recalcar que la categoría patogénica está definida únicamente por la presencia de factores de virulencia en la bacteria y que las pruebas bioquímicas, como la fermentación del sorbitol y las pruebas serológicas, deben ser complementadas, dado que algunos casos no correlacionan⁷⁻⁹. Es por tal motivo que las pruebas

Correspondencia: Blgo. José Carlos Huguet Tapia. División de Bacteriología - Laboratorio de Enteropatógenos - Instituto Nacional de Salud. Cápac Yupanqui 1400, Lima 11 - Perú.
Telf.: (0511) 4719920. Fax: (0511)4710179.
E mail: joscarhuguet@terra.com / enterop@ins.gob.pe

concluyentes para la detección de ECEH son el cultivo celular o la detección del gen que codifica la toxina Shiga y otros factores de virulencia típicos de ECEH mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)^{8,10-15}.

La epidemiología de esta bacteria indica que los mecanismos de transmisión están relacionados con el consumo de carne vacuna o productos lácteos contaminados¹⁶⁻¹⁷. Anualmente se reportan infecciones por esta bacteria en diferentes partes del mundo, sobre todo en países industrializados como Estados Unidos y Canadá⁷. En América del Sur, los países que reportan aislamientos de ECEH son principalmente Chile y Argentina^{18,19}.

En el Perú no existían reportes definitivos acerca de la presencia de esta bacteria. Sin embargo, en febrero del año 2001 se reportó en la ciudad de Tacna el primer aislamiento de esta categoría patogénica²⁰. En consecuencia, ante la presencia confirmada de ECEH en el Perú, se procedió a realizar la búsqueda retrospectiva del gen de la toxina Shiga en aislamientos de *Escherichia*

coli con serología relacionada a la categoría enterohemorrágica. A su vez, se completó la caracterización mediante métodos convencionales y moleculares del aislamiento *E. coli* O157:H7 procedente de la ciudad de Tacna (cepa Tacna410).

MATERIALES Y MÉTODOS

Con la finalidad de detectar el gen de la toxina Shiga en cepas de *Escherichia coli* se decidió realizar una selección retrospectiva de cepas de *E. coli* remitidas al Instituto Nacional de Salud durante los años 1999-2001. El criterio de inclusión fue el serotipo relacionado a la categoría ECEH⁷. Esta decisión fue tomada debido a que en muchos casos no se contó con la información exacta del cuadro clínico provocado por la cepa aislada. En ese sentido, fueron seleccionadas 43 cepas provenientes de los departamentos de Lima, Tacna, Cajamarca, Ayacucho, Lambayeque y La Libertad (Tabla N°1). Los serotipos seleccionados fueron O26, O111, O158, O157 y O127, incluyéndose además la cepa Tacna410 identificada como O157:H7²⁰.

Tabla N° 1. Cepas de ECEH analizadas en el estudio. Perú 1999 - 2001

	Procedencia	Serotipo	FS*	STX†	eae‡	Hem¶
L313	Lima	O26	-	-	-	+
L327	Lima	O111	-	-	-	-
L556	Lima	O111	+	-	-	-
L564	Lima	O26	+	-	-	-
L83	Lima	O158	+	-	-	-
L187	Lima	O127	+	-	-	-
L189	Lima	O158	+	-	-	-
A598	Ayacucho	O158	+	-	-	-
A604	Ayacucho	O127	+	-	-	-
A605	Ayacucho	O127	+	-	-	-
A607	Ayacucho	O127	+	-	-	-
L691	Lambayeque	O127	+	-	-	-
T947	Tacna	O127	+	-	-	-
T957	Tacna	O26	+	-	-	-
L304	Lima	O127	+	-	-	-
L232	Lima	O127	+	-	-	-
L207	Lima	O26	+	-	-	-
L230	Lima	O127	+	-	-	-
LA346	La Libertad	O127	+	-	-	-
A608	Ayacucho	O127	+	-	-	+
T957	Tacna	O26	-	-	-	-
L486	Lambayeque	O127	+	-	-	-
LM487	Lambayeque	O127	+	-	-	-
LM819	Lambayeque	O111	+	-	+	-
L558	Lima	O26	+	-	-	-
L707	Lima	O127	+	-	-	-
L706	Lima	O127	-	-	-	-
L316	Lima	O127	+	-	-	-
C551	Cajamarca	O158	+	-	-	-
T302	Tacna	O26	+	-	-	-
T558	Lima	O26	+	-	-	-
LM691	Lambayeque	O127	+	-	-	-
L189	Lima	O158	+	-	-	+
L186	Lima	O127	+	-	-	+
L204	Lima	O111	+	-	-	-
T410	Tacna	O157:H7**	-	STX II +	+	+
L303	Lima	O157:H?***	+	-	-	-
L304	Lima	O157:H?***	+	-	-	-
L305	Lima	O157:H?***	+	-	-	-
L305	Lima	O157:H?***	+	-	-	-
L307	Lima	O157:H?***	+	-	-	-
L308	Lima	O157:H?***	+	-	-	-
L309	Lima	O157:H?***	+	-	-	-

* FS : Fermentación del sorbitol.

† STX : Presencia del gen shiga toxina I o II.

‡ eae : Presencia del gen intimina.

¶ Hem : Actividad hemolítica en agar sangre.

** H? : Antígeno flagelar H7 negativo. No se evaluaron otros antígenos flagelares.

PROCEDIMIENTOS

Las cepas fueron reactivadas en medio TSB, incubadas a 37° C durante 8 horas, luego sembradas en medio MCS (Mc Conkey sorbitol), incubadas durante 18 horas, realizándose una confirmación bioquímica. Finalmente, se confirmó el serotipo respectivo de cada cepa utilizando antisueros polivalentes y monovalentes comerciales (Probac[®]), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para la extracción de ADN todas las cepas seleccionadas fueron sometidas a una lisis en medio TE pH 8 (Tris 10 mM EDTA 1 mM) mediante la adición de lisozima (1 mg/mL), sodio dodecil sulfato (SDS) al 0,5% y proteinasa K 10 mg/mL. La purificación de los ácidos nucleicos se realizó con una mezcla de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico, para finalmente precipitar el ADN con etanol absoluto y resuspenderlo en agua tridestilada.

El ADN de cada cepa seleccionada fue sometido a un PCR multiplex para amplificar el gen de la toxina shiga. Para

ello se utilizaron dos pares de oligonucleótidos iniciadores (VT1a, VT1b y VT2a, VT2b), los cuales fueron dirigidos a cada uno de los genes que codifican los dos tipos de toxina shiga existentes. VT1a y VT1b amplifican el gen de la toxina Shiga I, mientras que VT2a y VT2b amplifican el gen de la toxina shiga II) (Tabla N° 2).

La concentración final para la reacción de amplificación fue la siguiente: Buffer de reacción 1X (10 mM Tris-HCl, pH 8,3, 50 mM KCL, 0,01% de gelatina), cloruro de magnesio 2,5 mM, oligonucleótidos iniciadores (10 pmoles de cada uno), mezcla de nucleótidos trifosfatos 10 mM, enzima amplitaq polimerasa 1 U y ADN 10 ng. todo diluido en un volumen final de 25 mL. Luego, cada tubo de reacción fue sometido al siguiente ciclo de temperatura: 95°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de 95°C por 1 min., 52°C por 1 min. y 72°C por 1 min. 30 seg. por 30 ciclos, y finalmente una etapa de extensión de 72°C por 10 min. El producto de amplificación fue detectado mediante una electroforesis en un gel de agarosa al 2%.

Tabla N° 2. Secuencias de oligonucleótidos utilizados.

Oligonucleotido (5'→3')	Referencia
VT1a:	GAAGAGTCCGTGGGATTACG (11)
VT1b:	AGCGATGCAGCTATTAATAA (11)
VT2a:	TTAACCACACCCACGGCAGT (11)
VT2b:	GCTCTGGATGCATCTCTGGT (11)
SXTF:	ACTTCAGCCAAAAGGAACAC Este estudio
SXTR:	TGCACTTCAGCAAATCCG Este estudio
eaeP1:	CTGAACGGCGATTACGCGAA (21)
eaeP2:	CCAGACCATACGATCCAG (21)

Para el secuenciamiento del gen de la toxina shiga se diseñaron dos oligonucleótidos: SXTF y SXTR (Tabla N°2), que sirvieron como iniciadores para amplificar por PCR el gen en su totalidad. Una vez obtenido el producto, este fue ligado al plásmido pGEMt easy (Promega[®]), siguiendo las instrucciones del fabricante. El plásmido recombinante denominado pGEM-STX fue utilizado para transformar células de *E. coli* JM111 mediante electroporación. Las colonias de *E. coli* recombinantes fueron seleccionadas mediante aislamiento del plásmido pGEMT-STX y su análisis de peso molecular en un gel de agarosa al 1,5%. El plásmido pGEMT-STX fue purificado y secuenciado mediante el método de terminación de dideoxinucleótidos (sistema comercial Autocycle de la compañía Amersham Pharmacia Biotech[®]). La lectura de la reacción se realizó en un secuenciador automático ALF express (Amersham Pharmacia Biotech[®]) y la secuencia obtenida fue remitida al National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y fue comparada mediante la interfase Blast con secuencias referenciales del gen de la toxina shiga I y II.

Con la finalidad de completar la tipificación de la cepa Tacna410, se amplificó el gen eae mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para esta reacción se utilizaron dos oligonucleótidos iniciadores eaeP1 y eaeP2 (Tabla N°2). El protocolo de amplificación fue una

modificación de un PCR publicado anteriormente²¹. La reacción de amplificación se realizó con un volumen final de 25 mL, el cual contenía buffer de reacción 1X, cloruro de magnesio 2,5 mM, nucleótidos trifosfatos 100 mM, oligonucleótidos eaeP1 y eaeP2 (10 mM de cada uno), 50 ng de ADN y 1 U de enzima polimerasa. El ciclo de temperaturas para la amplificación fue el siguiente: 94° C durante 5 min., seguido de 30 ciclos de 95°C por 2 min., 55°C por 1 min y 72°C por 2 min. Finalmente, una etapa de extensión de 72°C por 10 minutos. El producto de amplificación fue detectado mediante una electroforesis en un gel de agarosa al 1%.

Finalmente, para detectar propiedades hemolíticas de la cepa Tacna410, fue sembrada en una placa conteniendo agar base sangre, suplementado con 10 mM de cloruro de calcio y 5% de glóbulos rojos, desfibrinados y lavados tres veces con PBS, incubándose durante 20 horas a 37°C⁸.

RESULTADOS

Los resultados bioquímicos confirmaron las cepas de *Escherichia coli*, encontrándose además una respuesta variable a la prueba de la fermentación del sorbitol. Sólo 5 cepas de *E. coli*, incluyendo la cepa Tacna410, fueron sorbitol negativo (Figura N°1).

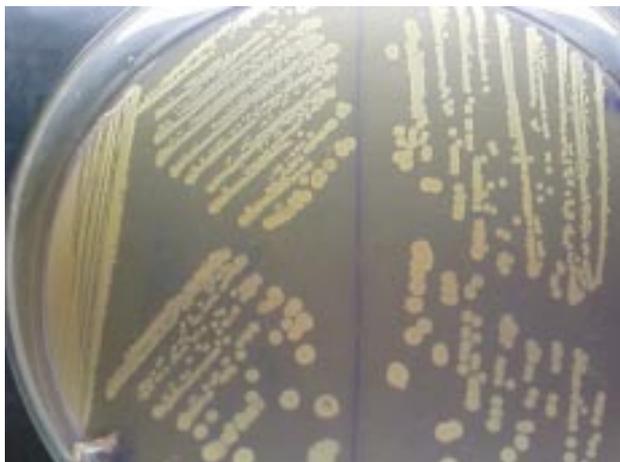


Figura N° 1. Agar MCS. Cepa Tacna 410 *Escherichia coli* McConkey Sorbitol negativo.

El resultado del PCR multiplex para la detección del gen de la toxina shiga, indicó la presencia de un producto de amplificación de aproximadamente 280 bp sólo en el aislamiento Tacna410. Este producto coincidió con el control positivo para el gen STLII que codifica la toxina Shiga de tipo II. Ninguno de los otros aislamientos seleccionados presentó amplificación de este gen.

Utilizando los oligonucleótidos SXTF y SXTR se obtuvo un producto de 1,252 bp y luego de clonarlo en plásmido pGEMT- easy y secuenciarlo, se descifró un total de 755 bp (487 bp por el extremo 5' y 268 bp por el extremo 3' del gen)(Figura N°2). La secuencia obtenida fue comparada con secuencias referenciales en el genbank, encontrándose una identidad de 100% con secuencias del gen de la toxina shiga de tipo II. Las secuencias obtenidas fueron remitidas al banco de genes con número de acceso AF378101 y AY126344 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

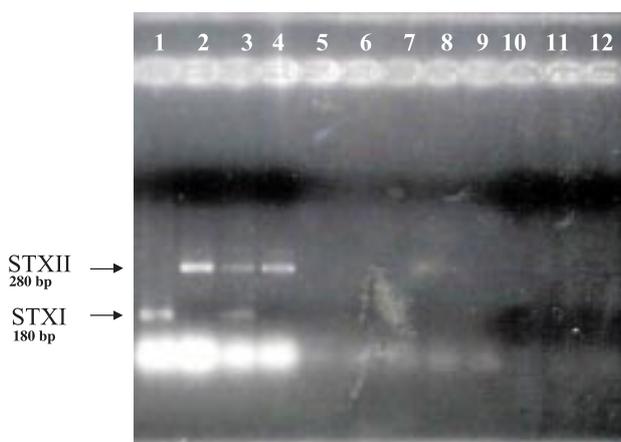


Figura N° 2. Detección por PCR del gen Shiga I y II. Carril 1: Patrón positivo para el gen de toxina Shiga I; Carril 2: Patrón positivo para el gen de toxina Shiga II; Carril 3: Patrón positivo para los genes Shiga I y II; Carril 4: Cepa Tacna410 (Shiga II); Carril 5: Patrón negativo; Carril 6 al 11: Cepas de *E. coli* 0157 negativas a STXI y STXII; Carril 12: Control del sistema.

Luego de evaluar la presencia del gen de la intimina (eae) en la cepa Tacna410, los resultados revelaron un producto de amplificación de aproximadamente 920 bp, los cuales concordaban con el producto de PCR de una cepa referencial positiva para el gen eae. De este modo, se comprobó la presencia del gen asociado al fenómeno de "attaching and effacing" en la cepa Tacna410 (Figura N°3).

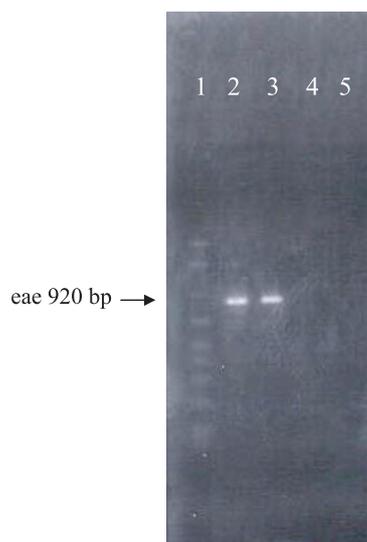


Figura N° 3. Detección por PCR del gen intimina eae. Carril 1: Marcador de peso molecular; Carril 2: Cepa referencial *E. coli* enteropatógena eae+; Carril 3: Cepa Tacna410 (eae+); Carril 4: Cepa *E. coli* control negativo para eae; Carril 5: Control del sistema.

Finalmente, al evaluar las propiedades hemolíticas de la cepa Tacna410, se pudo observar halos de hemólisis alrededor de las colonias de *E. coli* desarrolladas en las placas con agar sangre. Esta prueba indicó indirectamente la presencia del plásmido pO157 característico de ECEH, el cual contiene el gen de la enterohemolisina.

DISCUSIÓN

Los resultados encontrados confirman la presencia de *Escherichia coli* enterohemorrágica en el Perú, detectándose los tres principales marcadores genéticos que incriminan en forma definitiva a ECEH. Además, descartamos la posible presencia de cepas ECEH noO157:H7 no reportadas.

La detección de los tres factores de virulencia (Toxina shiga, gen eae y plásmido de 60 Mda) anteriormente mencionados, son importantes en la identificación de la categoría enterohemorrágica. Kaper y Nataro⁷ refieren que a través de muchas discusiones y consensos científicos se ha establecido que la definición de una típica ECEH es aquella *Escherichia coli* que presenta principalmente toxina shiga, es capaz de producir el fenómeno de "attaching and effacing" (presentan el gen eae) y lleva un plásmido pO157 de 60 Mda (el cual lleva el gen de la enterohemolisina). Es importante mencionar que existen reportes de cepas de *E.*

coli las cuales sólo presentan toxina shiga, denominándose a estas cepas por consenso *E. coli* Shiga toxina positiva (STEC), más no ECEH⁷. En el caso de la cepa Tacna410, fue importante confirmar la presencia de todos los factores de virulencia y de esta forma confirmar a este aislamiento como una ECEH típica.

Entre las cepas seleccionadas se encuentran aislamientos de *E. coli* serotipo O157:H7, a los cuales no se les detectó ningún tipo de toxina Shiga. Este resultado ratifica el hecho que, si bien el serotipo O157 se encuentra muy asociado a la categoría enterohemorrágica, este marcador serológico no es el más importante en la identificación de esta bacteria patógena. Sin embargo, no se descarta que estas cepas de *E. coli* serotipo O157 puedan haber portado en un primer momento el gen de la toxina shiga y posteriormente haberlo perdido, fenómeno descrito en algunas publicaciones²².

Queda aún en discusión la verdadera procedencia de la cepa *E. coli* Tacna410. Por antecedentes descritos, no se reportaron más casos de ECEH en la ciudad de Tacna a la posterior notificación del caso²⁰; pudiéndose postular que se trató de un hecho aislado y que fue una posible introducción de algún país sureño donde se reportan casos frecuentes de ECEH. Si bien en nuestra muestra se descarta la presencia de otros aislamientos de *E. coli* productoras de toxina shiga y enterohemorrágicas, se reportan en nuestro país importantes índices de diarrea con sangre, además de la presencia de casos de síndrome urémico hemolítico (SHU), cuadro clínico asociado a ECEH, dejando muchas veces sin una identificación clara del agente causal. Algunos antecedentes relacionan al SHU también con *Campylobacter* y *Shigella*²³⁻²⁵, quedando por entender el papel que cumple ECEH en los casos de diarrea con sangre y SHU, planteándose una interrogante sobre la epidemiología de esta bacteria en el Perú.

REFERENCIAS

1. **Clarke SC.** Diarrhoeagenic *Escherichia coli*—an emerging problem?. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2001; 41(3):93-8.
2. **Gilligan PH.** *Escherichia coli*. EAEC, EHEC, EIEC, ETEC. *Clin Lab Med* 1999; 19(3): 505-21.
3. **Goldwater PN, Bettelheim KA.** New perspectives on the role of *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohaemorrhagic *E. coli* serotypes in human disease. *J Med Microbiol* 1998; 47(12): 1039-45.
4. **Schmidt H.** Shiga-toxin-converting bacteriophages. *Res Microbiol* 2001; 152(8): 687-95.
5. **Sandvig K.** Shiga toxins. *Toxicon* 2001; 39(11): 1629-35.
6. **O'Loughlin EV, Robins-Browne RM.** Effect of Shiga toxin and Shiga-like toxins on eukaryotic cells. *Microbes Infect* 2001; 3(6): 493-507.
7. **Nataro JP, Kaper JB.** Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11(1): 142-201.
8. **Chinen I, Viboud, Pichel, M, Rivas, M, Binsztein N.** Manual de procedimientos. Parte I: *Escherichia coli* diarreigénica. Buenos Aires: Departamento de Bacteriología, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas ANLIS "Dr. Carlos Malbran"; 2000.
9. **Ammon A, Petersen LR, Karch H.** A large outbreak of hemolytic uremic syndrome caused by an unusual sorbitol-fermenting strain of *Escherichia coli* O157:H. *J Infect Dis* 1999; 179(5): 1274-7.
10. **Rivas M, Miliwebsky E, Balbi L, Garcia B, Leardini N, Tous M, et al.** Intestinal bleeding and occlusion associated with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O127:H21. *Medicina (B Aires)* 2000; 60(2): 249-52.
11. **Instituto Nacional de Salud.** Manual de procedimientos para la detección de *Escherichia coli* enterohemorrágica. Lima: INS; 1998.
12. **Blackburn CW, McCarthy JD.** Modifications to methods for the enumeration and detection of injured *Escherichia coli* O157:H7 in foods. *Int J Food Microbiol* 2000; 55(1-3): 285-90.
13. **Alexandre M, Prado V, Ulloa MT, Arellano C, Ríos M.** Detection of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in meat foods using DNA probes, enzyme-linked immunosorbent assay and polymerase chain reaction. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2001; 48(5): 321-30.
14. **Feng P, Monday SR.** Multiplex PCR for detection of trait and virulence factors in enterohemorrhagic *Escherichia coli* serotypes. *Mol Cell Probes* 2000; 14(6): 333-7.
15. **Fagan PK, Hornitzky MA, Bettelheim KA, Djordjevic SP.** Detection of shiga-like toxin (stx1 and stx2), intimin (eaeA), and enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) hemolysin (EHEC hlyA) genes in animal feces by multiplex PCR. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65(2): 868-72.
16. **Olsvik O, Wasteson Y, Lund A, Hornes E.** Pathogenic *Escherichia coli* found in food. *Int J Food Microbiol* 1991; 12(1): 103-13.
17. **Verweyen HM, Karch H, Brandis M, Zimmerhackl LB.** Enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections: following transmission routes. *Pediatr Nephrol* 2000; 14(1): 73-83.
18. **Cordovez A, Prado V, Maggi L, Cordero J, Martínez J, Misraji A, et al.** Enterohemorrhagic *Escherichia coli* associated with hemolytic-uremic syndrome in Chilean children. *J Clin Microbiol* 1992; 30(8): 2153-7.
19. **Padola NL, Sanz ME, Lucchesi PM, Blanco JE, Blanco J, Blanco M, et al.** First isolation of the enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O145:H- from cattle in feedlot in Argentina. *BMC Microbiol* 2002; 2(1): 6.
20. **Huapaya B, Huguet J, Suárez V, Torres Y, Montoya Y, Salazar E, et al.** Primer aislamiento de *Escherichia coli* O157:H7 enterohemorrágica en el Perú. *Rev Med Exp* 2001; 18(1-2): 38-9.
21. **Reid SD, Betting DJ, Whittam TS.** Molecular detection and identification of intimin alleles in pathogenic *Escherichia coli* by multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 1999; 37(8): 2719-22.
22. **Feng P, Dey M, Abe A, Takeda T.** Isogenic strain of *Escherichia coli* O157:H7 that has lost both Shiga toxin 1 and 2 genes. *Clin Diagn Lab Immunol* 2001; 8(4): 711-7.
23. **Ashkenazi S.** Role of bacterial cytotoxins in hemolytic uremic syndrome and thrombotic thrombocytopenic purpura. *Annu Rev Med* 1993; 44: 11-8.
24. **Chamovitz BN, Hartstein AI, Alexander SR, Terry AB, Short P, Katon R.** *Campylobacter jejuni*-associated hemolytic-uremic syndrome in a mother and daughter. *Pediatrics* 1983; 71(2): 253-6.
25. **Dickgiesser A.** *Campylobacter* infection and the hemolytic-uremic syndrome. *Immunol Infect* 1983; 11(3): 71-4.