

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Veterinarias

Tesis para aspirar al título de
“Magister de la Universidad de Buenos Aires en Salud Animal”

**Análisis de cepas diarreogénicas de *Escherichia coli* provenientes
de bovinos de Tierra del Fuego y su posible impacto en Salud**

**Lugar de Trabajo: Facultad de Ciencias Veterinarias, Cátedra de
Microbiología.**

Vet. María Paz Bonino

Directora: Dra. Adriana Bentancor

Codirectora: Mg. Ximena Blanco Crivelli

2019

Agradecimientos

Agradezco a mi familia por su apoyo incondicional.

A Adriana por la confianza, por las propuestas, por sumarme a su grupo y acompañarme a cada momento. A Osvaldo también, por siempre tener un consejo a mano.

A la Universidad de Buenos Aires y la Facultad de Ciencias Veterinarias por la formación constante.

A la Cátedra de Microbiología, por el apoyo y el espacio, especialmente a Elisa, mi compañera en todo este camino.

A Juan Petrina por la ayuda, la buena predisposición y el trabajo a la par.

A la Dra. Tânia A. Tardelli Gomes do Amaral por el espacio y el aprendizaje.

A Ximena, mi mamá postiza, con todo lo que eso implica.

A las del fondo, por las risas y la contención, aún mayores en los momentos de crisis.

A Yamila, por estar y ser un modelo a seguir.

.

Índice Temático

INTRODUCCIÓN	1
1.Introducción	2
1.1 <i>Escherichia coli</i>	2
1.2 <i>Escherichia coli</i> enteropatógena	3
1.2.1 EPEC y diarreas	6
1.3 <i>Escherichia coli</i> Shigatoxigénica	7
1.3.1 STEC y síndrome urémico hemolítico	10
1.4 Inmunidad cruzada entre EPEC y AE-STECS	11
1.5 Patovares híbridos de <i>Escherichia coli</i>	13
1.6 Síndrome urémico hemolítico y diarreas agudas en Argentina	14
1.7 Tierra del Fuego	19
HIPOTESIS Y OBJETIVOS	22
2. Hipótesis	23
3. Objetivos	23
3.1 Objetivo general	23
3.2 Objetivos particulares	23
MATERIALES Y MÉTODOS	24
4. Materiales y métodos	25
4.1 Obtención de muestras	25
4.2 Procesamiento de las muestras	25
4.2.1 Ruta EPEC y STEC no O157	27
4.2.2 Ruta STEC O157	27
4.2.2.1 Separación inmunomagnética anti-O157	27
4.2.3 Reacción en cadena de la polimerasa	27
4.2.3.1 PCR Múltiple	28
4.2.3.2 PCR <i>eae</i>	29
4.3 Caracterización de cepas aisladas	31
4.4 Cepas STEC	31
4.4.1 Subtipificación toxina Shiga	31
4.4.2 Producción toxina Shiga	34
4.5 Cepas EPEC	34
4.5.1 Detección del gen <i>bfpA</i>	34
4.5.2 Ensayos de adhesión en cultivo celular	34
4.5.2.1 Identificación del patrón de adhesión	34
4.5.2.2 Determinación de lesión A/E	36

4.6 Identificación de patovares de híbridos	37
4.7 Detección de la presencia de enterohemolisina Calcio dependiente	37
4.8 Susceptibilidad a antimicrobianos	38
4.9 Serotipificación de cepas aisladas	39
4.10 Análisis de los datos	39
4.11 MATERIALES Y MÉTODOS ADICIONALES	40
4.11.1. PCR con Hotstart taq	40
4.11.2 PCR-RFLP del gen que codifica la subunidad B de la toxina Shiga	40
RESULTADOS	41
5. Resultados	42
5.1 Obtención y procesamiento de muestras	42
5.2 Prevalencia STEC y EPEC	42
5.3 Caracterización de las cepas	43
5.4 Perfil genético y serotipos de las cepas aisladas	46
5.5 Producción de toxina Shiga	48
5.6 Ensayos en cultivo celular	48
5.7 Identificación de patovares híbridos	48
5.8 Producción de enterohemolisina Calcio dependiente	49
5.9 Susceptibilidad a antimicrobianos	49
5.10 Análisis de los datos	51
5.11 RESULTADOS ADICIONALES	51
DISCUSIÓN	54
6. Discusión	55
CONCLUSIONES Y PROSPECTIVAS	66
7. Conclusiones	67
8. Prospectivas	68
ANEXO	70
BIBLIOGRAFÍA	100
Bibliografía	101

Índice de tablas

Tabla 1. Casos y tasas de notificación de SUH por 100.000 habitantes según provincia de residencia. Argentina	17
Tabla 2. Mezcla de reactivos para PCR múltiple	28
Tabla 3. Mezcla de reactivos para PCR <i>eae</i>	29
Tabla 4. Cebadores utilizados para la detección de los marcadores de cepas STEC y EPEC	30
Tabla 5. Mezcla de reactivos para PCR subtipificación <i>stx1a</i> y <i>stx1d</i>	79
Tabla 6. Mezcla de reactivos para PCR subtipificación <i>stx1c</i>	80
Tabla 7. Mezcla de reactivos para PCR subtipificación <i>stx2a</i>	81
Tabla 8. Mezcla de reactivos para PCR subtipificación <i>stx2b</i> , <i>stx2e</i> , <i>stx2f</i> , <i>stx2g</i>	82
Tabla 9. Mezcla de reactivos para PCR subtipificación <i>stx2c</i>	83
Tabla 10. Mezcla de reactivos para PCR subtipificación <i>stx2d</i>	84
Tabla 11. Cebadores utilizados para la subtipificación de toxina Shiga	33
Tabla 12. Mezcla de reactivos para PCR <i>bfpA</i>	85
Tabla 13. Cebadores utilizados para la identificación del gen <i>bfpA</i>	34
Tabla 14. Mezcla de reactivos para PCR <i>saa</i>	86
Tabla 15. Mezcla de reactivos para PCR <i>aggR</i>	87
Tabla 16. Mezcla de reactivos para PCR <i>aaIC</i>	88
Tabla 17. Mezcla de reactivos para PCR <i>elt/est</i>	89
Tabla 18. Mezcla de reactivos para PCR <i>invE</i>	90
Tabla 19. Mezcla de reactivos para PCR <i>daa</i>	91
Tabla 20. Mezcla de reactivos para PCR <i>ehxA</i>	92
Tabla 21. Cebadores utilizados para la identificación del gen <i>ehxA</i>	37
Tabla 22. Mezcla de reactivos para PCR subtipificación <i>stx1a</i>	93
Tabla 23. Mezcla de reactivos para PCR subtipificación <i>stx1d</i>	93
Tabla 24. Mezcla de reactivos para PCR subtipificación <i>stx2a</i>	94
Tabla 25. Mezcla de reactivos para PCR subtipificación <i>stx2b</i>	94
Tabla 26. Cebadores de amplificación propuestos por Tyler	40
Tabla 27. Protocolo de subtipificación de <i>stx2</i> propuesto por Tyler	95
Tabla 28. Patrón de interpretación de PCR-RFLP.	95
Tabla 29. Muestras procesadas por departamento y tipo de producción	42

Tabla 30. Proporción STEC-EPEC según tipo de producción y departamento	42
Tabla 31. Resultados caracterización fenotípica y pruebas bioquímicas realizadas en las cepas STEC y EPEC aisladas	44
Tabla 32. Pruebas bioquímicas y sus fundamentos	97
Tabla 33. Perfil de virulencia de las cepas aisladas	47
Tabla 34. Interpretación de los resultados de susceptibilidad a antimicrobianos	50
Tabla 35. Medidas de halos en antibiograma por difusión	98
Tabla 36. Medidas de halos en antibiograma por difusión de evaluación de betalactamasas de espectro extendido	99
Tabla 37. Perfil de virulencia de las cepas aisladas	52

Índice de figuras

Figura 1. Casos y tasas de SUH (cada 100.000 habitantes). Argentina. Años 2014-2019 hasta SE30	16
Figura 2. Casos y tasas notificados de SUH en menores de 5 años. Argentina. Años 2014-2019 hasta SE30	16
Figura 3. Tasas de diarreas agudas (por 100.000 hab.). Dto. Ushuaia. Años 2013-2017	18
Figura 4. Tasas de diarreas agudas (por 100.000 hab.). Dto. Río Grande. Años 2013-2017	18
Figura 5. Algoritmo para detección de STEC y EPEC	26
Figura 6. Placa de 24 pozos y botella para cultivo celular	35
Figura 7. Algoritmo del ensayo de adhesión a cultivo celular en células HeLa	36
Figura 8. Ensayos de susceptibilidad	38
Figura 9. Disposición de discos para evaluar betalactamasas	39
Figura 10. Animales positivos por playa de faena	43
Figura 11. Evaluación de producción de toxina Shiga	48
Figura 12. Adhesión celular en línea HeLa y determinación de lesión A/E mediante tinción FAS	48
Figura 13. Adhesión celular en línea HeLa y determinación de lesión A/E mediante tinción FAS	48
Figura 14. Cepas aisladas sembradas en AGRSL y AGRL	49

Abreviaturas

AA adherencia agregativa

AB ácido bórico

A/E Adherencia y esfacelación

AE-STEC *Escherichia coli* Shigatoxigenico capaz de producir lesión A/E

aEPEC *Escherichia coli* enteropatógena atípica

AGRL agar glóbulos rojos lavados

AGRSL agar glóbulos rojos sin lavar

AK Amikacina

AMC agar Mac Conkey

AMC Amoxicilina – Clavulánico

AMP Ampicilina

APEC *Escherichia coli* patógeno aviar

BFP “*bundle forming pili*”

C Cloranfenicol

°C grados Celcius o centígrados

CAZ Ceftazidima

CIP Ciprofloxacina

CN Gentamicina

COL Colistina

CTS caldo tripteína soja

CT Cefixima – telurito de potasio

CTX Cefotaxime

CTX-C Cefotaxima Clavulánico

DA adherencia difusa

DAS diarrea aguda sanguinolenta

DAEC *Escherichia coli* de adherencia difusa

DEC cepas diarreogénicas de *Escherichia coli*

DMEM Dulbeccos´ modified Eagles médium

dNTP desoxirribonucleótido trifosfato

EAEC *Escherichia coli* enteroagregativa

ehxA enterohemolisina

EIEC *Escherichia coli* enteroinvasiva

EPEC *Escherichia coli* enteropatógena

Esp proteínas efectoras

ETEC *Escherichia coli* enterotoxigénica

FAS “fluorescent actin stain”

g gramo

Gb3 globotirosilceramida

h hora

H₂O_d agua destilada

HeLa Línea celular proveniente de cáncer cervico-uterino

HEPES compuesto químico ácido 4- (2-hidroxietil) -1-piperazina-metanosulfónico

IgA inmunoglobulina A

IgG inmunoglobulina G

IMI Imipenem

LA adherencia localizada

LAL adherencia simil localizada

LEE locus de esfacelación del enterocito

Lpf fimbria polar larga

M molar

MER Meropenem

ml mililitros

min minutos

NA ácido Nalidíxico

NMEC *Escherichia coli* asociado a meningitis

NOR Norfloxacin

NT no tipificable

OMS Organización Mundial de la Salud

PBS solución salina bufferada

PCR reacción en cadena de la polimerasa

S Estreptomina

SE semana epidemiológica

SIM separación inmunomagnética

SMAC agar Mac Conkey sorbitol

SNVS Sistema Nacional de Vigilancia de la Salud

SST3 sistema de secreción tipo 3

STEC *Escherichia coli* productora de toxina Shiga

Stx toxina Shiga

SUH síndrome urémico hemolítico

SXT Trimetoprima-Sulfametoxazol

Taq (ADN polimerasa) ADN polimerasa termorresistente de *Thermus aquaticus*

TBE buffer tris bórico EDTA

TDF Tierra del Fuego

TE Tetraciclina

tEPEC *Escherichia coli* enteropatógena típica

U unidades

UFC unidades formadoras de colonias

UPEC *Escherichia coli* uropatógena

UV rayos ultravioletas

µl microlitro

saa factor de adhesión autoaglutinante

Stx toxina Shiga

VT toxinas Vero

Resumen

Escherichia coli shigatoxigénico (STEC), con presentación endémica en Argentina, y *E. coli* enteropatógena (EPEC) son patovares de impacto en la niñez. La patogenia de STEC incluye cuadros asintomáticos, de diarrea leve y severa, síndrome urémico hemolítico (SUH), y en ocasiones la muerte del paciente. Se ha documentado como principal reservorio al bovino. Las cepas EPEC están asociadas a diarreas y constituyen la segunda causa de muerte en niños menores a 5 años. En Tierra del Fuego (TDF), la tasa de SUH y diarreas es elevada. La provincia de TDF no cuenta con estudios de portadores ni de reservorios de STEC ni EPEC. El objetivo de este estudio ha sido determinar la portación de STEC y EPEC en bovinos de TDF destinados a faena. Se realizó un estudio epidemiológico transversal observacional en Julio 2016 para la detección de STEC-LEE negativas, AE-STEC y EPEC. Las muestras se recolectaron en las dos playas de faena existentes en Ushuaia y Río Grande. Para cada animal se tomó una muestra por hisopado rectal. Se realizó pre-enriquecimiento en caldo tripteína soja seguido de siembra en agar Mac Conkey para la identificación de EPEC y STEC no-O157. Para STEC O157 se utilizó separación inmunomagnética. Se realizó PCR de *stx2*, *stx1*, *rfbO157* y *eae* a partir de la zona de confluencia con posterior rastrillaje de los patovares en muestras positivas. Las cepas aisladas fueron caracterizadas bioquímicamente y serotipificadas. En cepas STEC se caracterizó el subtipo *stx* mediante PCR, se evaluó la producción de toxina y de enterohemolisina calcio dependiente. En cepas EPEC se analizó la presencia de *bfp* y se evaluó fenotípicamente el patrón de adhesión. Además se buscó presencia de híbridos con otros patovares y se realizaron ensayos de susceptibilidad a antimicrobianos. Los resultados fueron analizados mediante test de diferencia de proporciones. Se analizaron 194 muestras de bovinos de TDF. La prevalencia de STEC fue del 15% (30/194), y de EPEC del 5% (10/194). Se aislaron 27 cepas STEC que pertenecieron a los siguientes serotipos O1:H21 (1/27); O6:H34 (1/27); O113:H21 (1/27); O130:H11 (1/27); O130:H- (1/27); O171:H2 (1/27); O174:H28 (1/27); O178:H19 (5/27); O179:H8 (1/27); O185:H7 (6/27); O185:H19 (7/27); O187:H7 (1/27), y una cepa EPEC O152:H25. No se detectaron cepas AE-STEC ni STEC O157 en este trabajo. En cepas STEC predominó la presencia de *stx2* (92,6%). Los tipos de toxinas detectados fueron *stx2* (16/27), *stx1/stx2* (9/27), *stx1* (2/27). El subtipo prevalente *stx2c* (37%). El 14% de las cepas presentó por lo menos algún subtipo de toxina no tipificable (4/27). La producción de toxina Shiga se detectó en 25/27 cepas. La cepa EPEC aislada resultó ser atípica (aEPEC), sin patrón de adhesión definido, con capacidad de generar lesión A/E. En total 16/28 cepas presentaron el gen que codifica para enterohemolisina (*ehxA*) y 12 fueron capaces de producir la enterohemolisina calcio dependiente. No se detectaron cepas de patovares híbridos. Todas las cepas evidenciaron resistencia a Ampicilina y 20/28 fueron resistentes a aminoglucósidos (20/20 a

Estreptomicina, con 6/20 resistentes a Estreptomicina y Amikacina). No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la detección de cepas STEC y EPEC al considerar el tipo de producción y la playa de faena. La relación EPEC/STEC detectada fue 1/3. Bajo este criterio la probabilidad de exposición en esta región a STEC sería tres veces mayor que a EPEC. Por otro lado se podría inferir que no existiría inmunidad protectora cruzada entre las cepas EPEC y las AE-STEC provenientes del ganado bovino.

Palabras clave: Bovinos, EPEC, STEC, SUH, Tierra del Fuego

Abstract

Shiga toxin producing *E. coli* (STEC), which has endemic presentation in Argentina, and enteropathogenic *E. coli* (EPEC), are probably the most significant pathogens, known for causing disease in childhood health. STEC pathogenesis includes mild to severe diarrhea, hemolytic uremic syndrome (HUS) which can lead to death. Cattle have been recognized as the main reservoir of STEC. EPEC causes diarrhea and have been reported to be the second cause of death in under five-year-old children. In Tierra del Fuego (TDF), SUH and diarrheas have high rates. There are no previous studies of carriers or reservoirs of STEC and EPEC in TDF. The aim of this study was to establish the prevalence of STEC and EPEC in cattle from slaughterhouses in TDF. A cross-sectional epidemiological study was carried out in July 2016 to determine the prevalence of STEC, EPEC and AE-STEC in cattle being raised for consumption in TDF. Samples were taken in two slaughterhouses in TDF (Ushuaia y Río Grande). We collected one rectal swab from each animal. For non-O157 STEC and EPEC each sample was enriched in tryptone soy broth. Later, the samples were cultivated on MacConkey agar. For O157 STEC immunomagnetic separation was carried out. Screening was carried out using conventional PCR for *stx1*, *stx2*, *rfbO157* and *eae* genes. Positive samples at screening were analysed looking for positive pathovar strains. Each isolated strain was biochemically characterized and serotyped. Subtyping of *stx1* and *stx2* were performed by PCR, and Shigatoxin and enterohemolysin production were carried out in STEC strains. The presence of the *bfpA* gene, and strain adhesion pattern was determined in isolated EPEC strains. Antimicrobial susceptibility was tested for each isolate. Statistical analysis was carried out using Test of Differences. A total of 194 samples were analysed. The prevalence of STEC was 15% (30/194), and the prevalence of EPEC was 5% (10/194). Twenty eight strains were isolated. STEC strains had the following serotypes: O1:H21 (1/27); O6:H34 (1/27); O113:H21 (1/27); O130:H11 (1/27); O130:H- (1/27); O171:H2 (1/27); O174:H28 (1/27); O178:H19 (5/27); O179:H8 (1/27); O185:H7 (6/27); O185:H19 (7/27); O187:H7 (1/27) and EPEC strain belong to O152:H25 serogroup. AE-STEC nor serogroup O157 were not detected in this study. The main toxin type in STEC strains was *stx2* (92,6%). The *stx* types detected were *stx2* (16/27), *stx1/stx2* (9/27) and *stx1* (2/27). The most prevalent *stx* genotypes was *stx2c* (37%). 14% of the strains showed at least one nontypeable subtype (4/27). Shiga toxin production was detected in 25/27 STEC strains. EPEC strain was categorized as atypical with no specific adhesion pattern and with the ability to cause A/E lesion. The *ehxA* gene was present in 16/28 strains, 12 of them produced enterohemolysin. There were no hybrid strains detected in this work. Antimicrobial susceptibility tests showed that all the strains were resistant to ampicillin, and 20/28 were resistant to aminoglycosides (20/20 streptomycin with 6/20 amikacin). No significant difference could be seen in the detection of STEC or EPEC by slaughterhouse or

production (extensive or intensive). EPEC/STEC relation was 1/3, which means that it's three times more likely to be infected by STEC than by EPEC and there is no cross reactive immunity between strains.

Key words: Cattle, EPEC, STEC, SUH, Tierra del Fuego

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1.1. *Escherichia coli*

Escherichia coli es un bacilo Gram negativo perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, que se encuentra adaptado al intestino del hombre y animales de sangre caliente formando parte de su microbiota.

Es un microorganismo anaerobio facultativo, de metabolismo respiratorio y fermentativo. Es mesófilo, con una temperatura óptima de crecimiento de 37°C. Existen cepas de *E. coli* móviles por flagelos peritricos, y algunas cepas poseen cápsula. No son formadoras de esporas. Bioquímicamente *E. coli* se caracteriza por ser oxidasa negativo, catalasa positivo, fermenta la glucosa con producción de ácido y gas y reduce nitratos a nitritos. Utiliza la vía fermentativa ácido-mixta y no así la butilenglicólica (Rojo de Metilo positivo, Voges Proskauer negativo). Es indol positivo, no utiliza citrato como fuente de carbono, no produce ácido sulfhídrico ni hidroliza la urea (Holt y col., 1994).

Existen cepas que no reaccionan de forma típica a algunas de estas pruebas bioquímicas, dificultando la identificación. Por ejemplo, solo el 90% de las cepas de *E. coli* fermentan la lactosa, ya que muchas cepas, incluso algunas patógenas, son típicamente lactosa negativos. La prueba de indol, positiva en el 99% de los casos, es uno de los mejores indicadores para diferenciar *E. coli* de otras enterobacterias (Nataro y Kaper, 1998).

Serológicamente, *E. coli* se clasifica según el tipo de antígeno O (somático), H (flagelar) y K (capsular).

Habitualmente las cepas no son patógenas y coexisten con el hospedador, produciendo enfermedad de manera ocasional en individuos inmunocomprometidos o cuando se rompen las barreras naturales de defensa del tracto intestinal. Mediante procesos naturales de intercambio, algunas cepas adquirieron elementos genéticos móviles y se convirtieron en patógenos con la capacidad de adaptarse a distintos hábitats y desarrollar enfermedad en el hospedador (Kaper y col., 2004).

Las cepas patógenas de *E. coli* expresan factores de virulencia específicos que facilitan su interacción con el hospedador, a través de distintos mecanismos tales como la capacidad de colonizar superficies epiteliales, atravesar las barreras mucosas, invadir el torrente sanguíneo y órganos internos, y/o producir toxinas causando daño celular (Piérard y col., 2012).

Las combinaciones más eficientes de factores de virulencia persistieron dando lugar a

los distintos “patovares” de *E. coli*. Se define entonces como patovar al grupo de cepas de la misma especie que causan la misma enfermedad a partir de factores de virulencia comunes (Kaper y col., 2004). Los cuadros clínicos por *E. coli* varían desde cuadros de diarrea aguda que se autolimitan, hasta enfermedades intestinales y extraintestinales que pueden comprometer la vida del paciente (Piérard y col., 2012).

Dentro de las cepas intestinales y diarreogénicas de *E. coli* (DEC) existen seis categorías descriptas:

- *E. coli* enteropatógena (EPEC)
- *E. coli* shigatoxigénica (STEC)
- *E. coli* enterotóxica (ETEC)
- *E. coli* enteroinvasiva (EIEC)
- *E. coli* enteroagregativa (EAEC)
- *E. coli* de adherencia difusa (DAEC)

Con respecto a las cepas extraintestinales, podemos mencionar:

- *E. coli* uropatógena (UPEC) que genera afecciones urinarias
- *E. coli* asociada a meningitis (NMEC) que produce cuadros neurológicos

Los patovares EPEC, STEC y ETEC han sido ocasionalmente asociados a enfermedad en animales (Kaper y col., 2004; Mercado y col., 2004a; Mercado y col., 2004b; Pestana de Castro y col., 2010). Particularmente en los cerdos se distingue una variante de STEC que genera edemas y muerte en lechones en edad de destete (Pestana de Castro y col., 2010; Tabaran y Tabaran, 2019). También se ha identificado una cepa aviar (*E. coli* patógeno aviar o APEC) que causa enfermedad en las aves afectando el sistema respiratorio (Kaper y col., 2004).

Los patovares DEC tienen gran impacto en la salud de infantes, destacándose por la gravedad de los cuadros que generan EPEC y STEC (Trabulsi y col., 2002).

1.2. *Escherichia coli* enteropatógena

E. coli enteropatógena se caracteriza por adherirse al epitelio intestinal y producir una lesión de adherencia y esfacelación (A/E, del inglés “*attaching and effacing*”), sin la producción de toxina Shiga propia de STEC, ni toxinas termolábil y termoestable típicas de ETEC. La lesión A/E resulta de la acción conjunta de proteínas efectoras codificadas a nivel de una isla de patogenicidad llamada LEE (locus de esfacelación del enterocito) (Nataro y Kaper, 1998).

Las cepas EPEC pueden ser diferenciadas en típicas (tEPEC) o atípicas (aEPEC), basado en la capacidad de expresar o no (respectivamente) una fimbria de tipo IV llamada “*bundle forming pili*” (BFP). Esta fimbria se encuentra codificada por el operón *bfp*, incluido dentro del plásmido EAF (factor de adherencia de EPEC). Uno de los genes más importantes dentro del operón es *bfpA* (Gomes y González-Pedrajo, 2010). Algunas cepas aEPEC pueden portar un operón *bfp* defectuoso, que no es funcional al no permitir la producción de BFP (Gomes y col., 2016). En cultivo celular, las cepas tEPEC se adhieren formando microcolonias compactas en la superficie de las células. Este tipo de patrón de adhesión se conoce como “adherencia localizada” (LA), y es mediado por BFP, que estabiliza la unión entre las bacterias para formar las microcolonias y promueve una adhesión superficial no íntima con las células. Las cepas aEPEC producen un patrón de adhesión modificado que se conoce como “adherencia simil localizada” (LAL), con aglomerados de colonias menos compactos y se observan en menor cantidad de células. Existen cepas de aEPEC que expresan patrones de adhesión alternativos *in vitro*, tales como el patrón de adherencia difusa (DA) o adherencia agregativa (AA) (Gomes y González-Pedrajo, 2010). Los patrones de adhesión de aEPEC se manifiestan en ensayos de adhesión prolongados (6 h) (Gomes y col., 2016).

Las cepas tEPEC raramente se encuentran en animales, mientras que aEPEC ha sido hallada en diferentes especies, tanto en ejemplares sanos como con diarrea (bovinos, ovinos, cabras, cerdos, aves). Si bien no hay evidencia de transmisión al humano, numerosas cepas encontradas en animales se corresponden con casos de diarrea, sugiriendo que los animales son un posible reservorio de este patovar (Gomes y González-Pedrajo, 2010).

Las cepas EPEC más estudiadas pertenecen a determinados serogrupos, denominados en conjunto serogrupos EPEC. La Organización Mundial de la Salud (OMS) reconoció en 1987 dentro de estos serogrupos a O55, O86, O114, O119, O125, O126, O127, O128, O142 y O158, tanto en cepas típicas como atípicas. También se incluyen los serogrupos O26 y O111, considerados a su vez propios de STEC, y frecuentemente asociados a enfermedad en humano, formando parte de los “*Big Six*” (los seis serogrupos de STEC de mayor importancia por su asociación a cuadros clínicos en humanos). Algunos estudios evidenciaron que existen cepas del mismo serogrupo con distintas características, e incluso cepas EPEC que no podían incluirse dentro de los serogrupos clásicos. La mayor variabilidad se observó en las cepas aEPEC (Trabulsi y col., 2002).

Para lograr la colonización de la mucosa intestinal, EPEC realiza un proceso en tres etapas. En un primer momento se produce una adherencia superficial no íntima en la que interviene BFP, aunque no se descarta que haya otros factores involucrados. Luego se produce el ensamblaje del sistema de secreción tipo 3 (SST3); esta estructura es la responsable de inyectar las proteínas efectoras en la célula blanco. Finalmente tiene lugar

una adhesión íntima al enterocito y la consecuente lesión de tipo A/E. Esta última fase (fase de adhesión íntima) esta mediada por una proteína llamada intimina, codificada por el gen *eae*, presente en LEE. Es una proteína de la membrana externa de la bacteria, variable en su composición de aminoácidos en la porción carboxilo (C) terminal, mientras que la porción amino (N) terminal es conservada. Las diferencias en la porción C terminal permitieron definir distintos subtipos de intimina, denominados con letras griegas (Gomes y González-Pedrajo, 2010). Las cepas de tipo aEPEC mostraron mayor variabilidad en su tipo de intimina que las tEPEC. La porción conservada permanece adherida a la membrana de la bacteria, mientras que la porción variable está expuesta y es la que finalmente interactúa con el receptor Tir (del inglés "*translocated intimin receptor*"). Este receptor es inyectado al citosol de la célula blanco gracias a la acción del SST3, exponiéndose luego en la membrana plasmática (Trabulsi y col., 2002).

La información para el ensamblaje del SST3 se encuentra codificada en la isla de patogenicidad LEE. El SST3 es una estructura macromolecular compleja que atraviesa las membranas de la bacteria y extiende una proyección simulando una jeringa. Esta proyección genera un poro en la célula eucariota, a través del cual se transportan distintas proteínas efectoras hacia el citoplasma. Una de estas proteínas es el receptor Tir, y la unión intimina-receptor permite que la bacteria se una íntimamente al epitelio intestinal, desencadenando señales que culminan con la desorganización del citoesqueleto y polimerización de actina por debajo del punto de contacto. El daño celular generado incluye la formación de estructuras como pedestales y la pérdida de las microvellosidades del enterocito (Kaper y col., 2004).

En infecciones severas, la destrucción del epitelio absortivo es completa, determinando junto con otros factores (transporte de iones, alteraciones en las uniones intercelulares) la aparición de diarrea (Gomes y González-Pedrajo, 2010).

Distintos estudios demostraron que cepas aEPEC con intimina truncada aún permanecían adheridas a las células a través del SST3, resaltando la importancia de esta estructura en la interacción bacteria-célula. También se evidenciaron estructuras proteicas dentro del flagelo con potencial de adherencia (Gomes y col., 2016).

Otras proteínas efectoras secretadas por el SST3 (Esp) afectan el proceso normal de la célula intestinal, alterando la función de las mitocondrias, la integridad de las uniones intercelulares y pueden eventualmente llevar a la muerte del enterocito (Scaletsky y Fagundes-Neto, 2016).

1.2.1. EPEC y diarreas

El patovar EPEC es señalado como productor de diarrea en infantes. La transmisión del patógeno ocurre por vía fecal-oral a través de fuentes contaminadas y contacto con

reservorios. La dosis infectiva para causar enfermedad en niños no se conoce. Los brotes en adultos, aunque no ocurren normalmente, suelen estar asociados a la ingesta de agua y alimentos contaminados con dosis infectivas superiores a 10^6 (OPS/OMS Peligros Biológicos, Inocuidad de alimentos).

Este agente afecta sobre todo a niños menores de un año. A medida que el hospedador alcanza mayor edad las infecciones se hacen menos frecuentes. Este incremento de la resistencia al patógeno puede estar asociado a la pérdida de receptores específicos junto con desarrollo del sistema inmune (Gomes y González-Pedrajo, 2010). Sin embargo, se han detectado cepas aEPEC en pacientes de distintas edades incluso en adultos inmunocomprometidos (Gomes y col., 2016).

La enfermedad causada por EPEC varía desde infecciones subclínicas hasta cuadros fatales. La diarrea es de presentación aguda, con evolución a diarrea persistente en algunos casos. Además de diarrea, el cuadro clínico puede incluir vómitos, deshidratación, y fiebre. Puede incluso evolucionar a intolerancias y alergias (Scaletsky y Fagundes-Neto, 2016). El cuadro clínico se desencadena por múltiples mecanismos, incluyendo secreción activa de iones, aumento de la permeabilidad intestinal, inflamación, y pérdida del epitelio con función de absorción como resultado del daño a las microvellosidades (Kaper y col., 2004).

Se ha definido a EPEC como la principal causa de diarrea infantil en países en desarrollo. En los países desarrollados han disminuido los casos por este agente, pero no dejan de ser una importante causa de enfermedad (Trabulsi y col., 2002). Se ha reportado que las infecciones diarreogénicas constituyen la segunda causa de muerte en niños menores a 5 años y son responsables de 1 – 5 millones de muertes de niños por año (WHO, 1998). De ellas, EPEC junto a Rotavirus, Calicivirus y ETEC causaron más de la mitad de los casos (Farfán-García y col., 2016). En Argentina, la incidencia de diarreas infantiles es de 150/100.000 en niños menores de cinco años, y EPEC es uno de los agentes más prevalentes (Rivas y col., 2010; Alonso y col., 2014).

Por muchos años, los estudios realizados asociaron a tEPEC con cuadros de diarrea. La asociación con la enfermedad fue mayor en niños menores a 6 meses de edad. Sin embargo, estudios recientes no detectaron una asociación significativa entre el tipo tEPEC y la enfermedad. Mientras la proporción de casos asociados a este tipo de cepas desciende, la proporción de casos asociados a aEPEC aumenta (Ochoa y col., 2008; Scaletsky y Fagundes-Neto, 2016). Las cepas aEPEC se consideran patógenos emergentes, sobre todo en países en desarrollo, produciendo diarrea aguda y persistente, afectando tanto a niños como a adultos.

El plásmido EAF no es esencial para generar lesión A/E, pero colabora a que el proceso

sea más eficiente (Trabulsi y col., 2002). Si bien las cepas aEPEC no portan este plásmido, en estudios realizados por Nguyen y col. (2006), aEPEC ha sido detectado con gran frecuencia en niños con diarrea. Estos cuadros fueron persistente, y fue más frecuente en niños menores de un año.

Si bien EPEC es considerado un patógeno extracelular, existen cepas con el potencial de ser invasivas (Scaletsky y Fagundes-Neto, 2016). Esta propiedad podría contribuir a la evasión del sistema inmune, la resistencia a antibióticos, y en consecuencia a la persistencia de los cuadros clínicos.

1.3. *Escherichia coli* Shigatoxigénico

E. coli Shigatoxigénico (STEC) se caracteriza por producir al menos un tipo de una potente citotoxina con la capacidad de inhibir la síntesis proteica en células eucariotas. Estas citotoxinas se denominaron toxinas Vero (VT) por el daño que ejercen en la línea celular Vero, y toxinas Shiga (Stx) por su similitud con la toxina producida por *Shigella dysenteriae* tipo I (Guth y col., 2010).

La información para la toxina Shiga se encuentra codificada en genes provenientes de fagos que se insertan en el cromosoma de la bacteria, y que pueden perderse o ser adquiridos por las diferentes cepas de *E. coli*, tanto *in vivo* como *in vitro*. Es una toxina del tipo AB (dos subunidades separadas), que cuenta con una copia de la subunidad A y cinco copias de la subunidad B. El dominio A es el que ejerce la función tóxica, mientras que el dominio B reconoce glicolípidos específicos en la membrana citoplasmática de las células eucariotas (globotriaosilceramida o Gb3) que actúan como receptores. La toxina atraviesa el epitelio por transcitosis, y viaja por sangre para finalmente unirse a Gb3 en las células endoteliales, especialmente en los vasos sanguíneos renales (Mainil, 2013).

El colon es el sitio donde se asientan principalmente las lesiones histológicas causadas por STEC, y durante el proceso inflamatorio, se facilita el pasaje de Stx al torrente sanguíneo con el consecuente desarrollo de enfermedad (Rivas y col 2016).

La unión al receptor permite que Stx ingrese a la célula, y mediante transporte retrógrado a través del Aparato de Golgi (donde la subunidad A es clivada a su forma activa por enzimas), llegue al ribosoma donde afecta al ARNr inhibiendo la síntesis proteica. El daño generado provoca la muerte celular (Mainil, 2013).

La familia Stx está compuesta por dos tipos de toxinas (Stx1 y Stx2) que comparten estructura y función, pero tienen diferencias a nivel antigénico, de actividad biológica y de afinidad con su receptor. Dentro del tipo Stx1 encontramos los subtipos Stx1a, Stx1c, y Stx1d;

mientras que Stx2a, Stx2b, Stx2c, Stx2d, Stx2e, Stx2f, y Stx2g son subtipos de Stx2 (Scheutz y col., 2012). La variación detectada entre subtipos determinó que algunos de ellos hayan sido difíciles de identificar, y en 2015 Scheutz informó la presencia de subtipos no tipificables (Scheutz y Würzner, 2015). Recientemente se han reportado los subtipos Stx2h y Stx2i (Werber y Scheutz, 2019), y en el informe del panel EFSA BIOHAZ (2020) se describe la presencia de 4 subtipos de *stx1* (a, c-e) y 12 de *stx2* (a-l) basados en secuencias nucleotídicas y al menos 18 variantes genéticas de *stx2d* (EFSA BIOHAZ, 2020).

Las cepas STEC son agentes zoonóticos. Son mayormente patógenas para humanos, y su principal reservorio son los rumiantes (particularmente ganado bovino, y también ovinos y caprinos) (Parma y col., 2000; Piérard y col., 2012). Este patógeno puede colonizar el intestino de los rumiantes, pero la toxina no atraviesa la barrera intestinal ni logra unirse a los vasos sanguíneos ya que las células animales no cuentan con receptores Gb3 (Mainil, 2013). Es por esto que los animales no suelen presentar signos clínicos, aunque en ocasiones pueden aparecer diarreas, y en los cerdos existe una presentación sistémica con daño de vasos sanguíneos y edema causado por *stx2e* que tiene afinidad por el receptor Gb4 presente en el enterocito del cerdo (Guth y col., 2010). Los bovinos portadores de STEC tampoco manifiestan signos de enfermedad durante el periodo de eliminación del patógeno por materia fecal. Los distintos modelos que se realizaron para comprender la dinámica de la excreción y transmisión de este patógeno, determinaron que existen ejemplares de ganado bovino que eliminan STEC en mayor proporción que otros animales, por lo que se los denominó “*super shedders*”. El término hace referencia tanto a la cantidad de microorganismos excretados por gramo de materia fecal, como al tiempo durante el cual el animal elimina al agente (Menrath y col., 2010). La persistencia de STEC en ganado puede deberse a la capacidad del microorganismo de colonizar el tracto gastrointestinal, en particular el colon, la mucosa terminal del recto y la unión recto anal (Etcheverría y Padola, 2013).

La prevalencia de STEC en la materia fecal del ganado y en carcasas es altamente variable, dependiendo de la región, tipo de animal, edad, estación del año, entre otros factores. La mayoría de los reportes indican un aumento en la casuística de infección por STEC en época estival (Rivas y col., 2014) y se ha demostrado que la prevalencia en bovinos fluctúa durante el año llegando a los niveles más altos en verano (Rivero y col., 2012; Fernández y col., 2013). Se señaló que el riesgo de infección en el hombre aumenta en primavera verano, asociado al aumento de la prevalencia de STEC en el ganado (Rivas y col., 2014).

El serotipo STEC O157:H7 es el prototipo de este grupo de patógenos; representa el serotipo prevalente responsable de los cuadros clínicos más graves en humano. No obstante, más de 400 serotipos de *E. coli* pueden presentar la información necesaria para sintetizar la toxina Shiga. Además de O157, existen otros serogrupos implicados en brotes importantes de

enfermedad en humano que han sido denominados por los norteamericanos “*Big Six*”, incluyendo O26, O45, O103, O111, O121, y O145 (Acuña y col., 2019).

Si bien Stx es el factor de virulencia que caracteriza a este patovar, existen factores adicionales, como adhesinas, proteasas, otras toxinas, que contribuyen a que progrese la infección. La habilidad de colonizar el intestino es un paso clave para el desarrollo de enfermedad. En el caso de las cepas STEC, estas expresan una gran variedad de adhesinas cuya función es esencial para permitir la persistencia en el tracto gastrointestinal de los rumiantes, y pueden a su vez otorgar la capacidad de formar biofilm en diferentes superficies celulares (Etcheverría y Padola, 2013).

Existen cepas de STEC que cuentan con la isla de patogenicidad LEE y en consecuencia con la capacidad de adherirse íntimamente al epitelio intestinal y generar lesión A/E. Fakh y col., (2017) denominaron a estas cepas AE-STECS. Las cepas AE-STECS están asociadas a enfermedad en el humano en un 80% de los casos. De todas formas, se ha evidenciado que la presencia de LEE no es limitante para el desarrollo de la infección (Rivas y col., 2016). Las cepas que no cuentan con la isla de patogenicidad LEE se denominan LEE negativas (Newton y col., 2009).

Otros factores de virulencia descritos incluyen la enterohemolisina (*ehxA*), y el factor de adhesión autoaglutinante (Rivero y col., 2010). Este último se encuentra codificado por el gen *saa*, y está asociado a cepas LEE negativas. Muchas veces las cepas STEC-LEE negativas pueden portar en un plásmido la información conjunta para expresar ambos factores de virulencia (Paton y col., 2001).

Torres y col. (2004) describieron en cepas STEC dos clusters genéticos (*lfpA1* y *lfpA2*) relacionados con el operón de la fimbria polar larga (*lfp*) de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Aquellos microorganismos que contenían esta información eran capaces de expresar la fimbria, y se detectaron diferentes tipos de *lfpA* en cepas LEE negativas. Estudios realizados demostraron que no había diferencias significativas en la capacidad de adhesión de las cepas cuando se anulaba el gen *lfpA1* por mutación, pero si se afectaba al mutar en conjunto *lfpA1* y *lfpA2*. Además de su función de adherencia, existen estudios que aportan evidencia al rol de la fimbria como estimulador de la respuesta inflamatoria ante una infección por STEC (Vergara y col., 2015).

1.3.1. STEC y síndrome urémico hemolítico

La infección por STEC en el humano ocurre por consumir productos de origen animal contaminados con materia fecal (principalmente de ganado bovino), como carne mal cocida. Otras formas de transmisión incluyen lácteos no pasteurizados, vegetales frescos o fruta mal lavados y agua contaminada de consumo o recreacional (Piérard y col., 2012). El contacto

directo o indirecto con animales cumple un rol importante en la transmisión de enfermedad, seguido por el contacto persona a persona. Los cuadros clínicos generados por STEC en el humano varían desde cuadros asintomáticos, diarrea acuosa, diarrea aguda sanguinolenta (DAS), y por último un cuadro sistémico llamado síndrome urémico hemolítico (SUH), que puede comprometer la vida del paciente (Guth y col., 2010). La diarrea acuosa aparece en el 90% de los casos, y progresa a diarrea sanguinolenta, presentándose el SUH en el 5 -15% de los pacientes. No hay tratamiento específico para esta infección, ya que las terapias con antibióticos o drogas que afectan la motilidad intestinal se han asociado a mayor riesgo de aparición de complicaciones (Rivero y col., 2010).

El SUH es una enfermedad de comienzo agudo, que se caracteriza por presentar la tríada anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia y daño renal, generalmente asociado a un episodio de diarrea con o sin sangre, principalmente en lactantes y niños en la primera infancia. Puede afectar otros órganos como sistema nervioso central, pulmones, páncreas y corazón, y puede llevar a la muerte debido a complicaciones neurológicas, intestinales, cardíacas o a infecciones concomitantes. El período de incubación es de dos a diez días (Boletín Integrado de Vigilancia 222, 2014).

Manning y col. (2008), estudiaron la diversidad genética de cepas de *E. coli* O157:H7, evaluando polimorfismos de nucleótido único (SNP). Según genotipo y análisis filogenético, establecieron distintas correlaciones y finalmente definieron 9 clados. Análisis epidemiológicos posteriores mostraron una alta asociación entre cepas del clado 8 (caracterizado como hipervirulento) y SUH. El estudio de las variantes de toxina Shiga mostró que la mayoría de las cepas de este clado tienen el genotipo *stx2a/stx2c*. En Argentina se reportó la circulación de cepas de STEC O157 del clado 8 en forma casi exclusiva (Pianciola y col., 2014). Estas cepas son responsables de una enfermedad más severa, de progresión rápida, que dificultaría el diagnóstico durante la primera fase de diarrea, detectándose el agente etiológico recién una vez establecido el SUH (Boletín Integrado de Vigilancia 222, 2014).

Se reconoce que algunos de los subtipos de Stx tienen mayor relevancia clínica que otros, ya que se han asociado a casos más severos de enfermedad. Aquellas cepas que producen Stx2a, Stx2c, o Stx2d son más virulentas que aquellas que producen solo Stx2b, Stx1a y Stx1c o la combinación de ambas toxinas Stx1/Stx2 (Scheutz, 2014). No se sabe con certeza a que se debe la diferente toxicidad entre los distintos subtipos de toxina, se sugiere que puede deberse a variaciones en la actividad enzimática o en la afinidad con sus receptores. Los subtipos *stx2e*, *stx2f* y *stx2g* suelen encontrarse en cepas aisladas de animales (Rivas y col., 2016), Las cepas *stx2e* rara vez se encuentran en STEC asociadas con enfermedades humanas, las cepas *stx2f* se han aislado recientemente de pacientes con

SUH y también el subtipo *stx2g* rara vez se asocia con enfermedades humanas y no suele estar asociado con enfermedad severa (Friesema y col., 2014; EFSA BIOHAZ, 2020).

La presencia de los genes *stx2a* y *eae* se consideran predictores del desarrollo de SUH. De todas formas, existen cepas altamente patógenas (como aquellas que producen Stx2d activable por enzimas de mucus intestinal) que no presentan el gen *eae* y que han causado brotes y casos esporádicos de SUH (Rivas y col., 2014),

1.4. Inmunidad cruzada entre EPEC y AE-STE C

Los anticuerpos pueden evitar la adherencia de enteropatógenos a los enterocitos. Tanto la inmunoglobulina A (IgA) presente en mucosa intestinal y leche materna, como la IgG en suero, cumplen una función protectora (Levine y Robins-Browne, 2012). Son especialmente importantes los anticuerpos calostrales, ya que pueden actuar frente a los patógenos que afectan infantes (Scaletsky y Fagundes-Neto, 2016). Este tipo de inmunidad podría prevenir enfermedad, aunque no siempre logra eliminar a los agentes (Levine y Robins-Browne, 2012).

Diversos estudios realizados en zonas donde EPEC es endémica (Parissi Crivelli y col., 2000; Martinez y col., 1999) lograron demostrar la existencia de anticuerpos contra los principales factores de virulencia de este patovar en muestras de suero infantil, materno, y en muestras de calostro. Dentro de estos factores, codificados en la isla de patogenicidad LEE, se destacan la proteína de membrana intimina, el receptor Tir, y numerosas proteínas efectoras (EspA, EspB). A su vez, otro factor de importancia que se puede detectar es la respuesta inmune a la fimbria BFP de las cepas tEPEC (codificada por el plásmido EAF) (Parissi Crivelli y col., 2000).

La detección de anticuerpos contra los factores de virulencia se utiliza como marcador de contacto con el patógeno, ya que la respuesta inmune está asociada a la producción de esos factores *in vivo*. Martinez y col. (1999) analizaron el desarrollo de anticuerpos específicos contra intimina, BFP o diversas Esp durante la infección natural por EPEC, observando que el 76,4% de los niños muestreados con cuadros de diarrea de 10 o más días de evolución presentaron anticuerpos contra BFP. Por otro lado, la detección de anticuerpos anti-intimina y anti-Esp fue variable, y se asoció a la cepa que ocasionó el cuadro. Por otro lado, al evaluar muestras de niños sanos, no se detectaron anticuerpos contra EPEC, a pesar de pertenecer todos a una zona endémica. Este fenómeno podría atribuirse a la ausencia de contacto con el patógeno o a una vida media corta de los anticuerpos circulantes.

Los resultados obtenidos por Loureiro y col., (1998), evidenciaron que las muestras de

calostro obtenidas de madres en San Pablo (Brasil) contenían anticuerpos reactivos contra íntima, BFP y Esp.

Parissi Crivelli y col. (2000) analizaron la respuesta del sistema inmune ante factores de virulencia específicos mediante un ensayo en México (zona endémica de EPEC) donde evaluaron la producción de anticuerpos en calostro y suero de madres, y en suero de sus hijos al momento del nacimiento y a los seis meses. Lograron determinar que es posible detectar en suero y en calostro anticuerpos contra los distintos factores de virulencia de EPEC (BFP, íntima, EspA y EspB). En esas muestras de calostro se detectaron con mayor frecuencia anticuerpos anti EspA e íntima, seguidos por anti EspB y BFP, mientras que al analizar el suero materno, pocas muestras contaron con anticuerpos capaces de reconocer a BFP. Los anticuerpos presentes en las muestras de suero neonatal reaccionaron principalmente contra íntima y EspB, mostrando una reacción contra BFP del 9,5%. Este patrón se modificó al analizar suero de los niños de 6 meses de edad, donde los anticuerpos anti BFP se evidenciaron en el 71% de las muestras. Si bien los anticuerpos anti BFP no predominaron en las muestras maternas, sí se detectaron en el suero de los niños de seis meses, lo que sugiere que los niños fueron capaces de desarrollar los anticuerpos al contactar con el agente en algún punto desde el nacimiento hasta la toma de muestra. La frecuencia de anticuerpos contra íntima fue relativamente alta, lo que puede reflejar la alta prevalencia en el ambiente de agentes con la capacidad de producirla, o el gran potencial antigénico de esta proteína (Parissi Crivelli y col., 2000).

Las cepas AE-STE C cuentan al igual que EPEC con la isla de patogenicidad LEE. Esto les permite generar los factores de virulencia mencionados y producir en consecuencia la lesión A/E. Existe un importante grado de homología en los genes presentes en esta isla de patogenicidad entre EPEC y AE-STE C (Calderon Toledo y col, 2011). Los pacientes que sufren SUH a partir de cepas AE-STE C desarrollan una buena respuesta inmune contra los factores codificados por LEE (Kaper y col., 2004).

Las infecciones por AE-STE C se presentan mayormente en países desarrollados, con la excepción de Argentina. La baja prevalencia de infecciones AE-STE C en países en desarrollo, endémicos para EPEC, podría deberse a la presencia de anticuerpos circulantes contra los antígenos comunes de EPEC y AE-STE C (Parissi Crivelli y col., 2000; Calderon Toledo y col., 2011).

Calderon Toledo y col. (2011), llevaron a cabo experimentos en ratones BALB/c para evaluar si la infección por EPEC podría ser un factor de protección ante una posterior infección con AE-STE C . Los ratones BALB/c (tratados previamente con ampicilina para eliminar la microbiota comensal) se utilizaron como modelos de enfermedad ya que al ser expuestos a

AE-STEC manifestaron signos clínicos similares a los del humano (signos neurológicos y sistémicos, incluyendo patologías renales, gastrointestinales, y trombocitopenia). En primera instancia, un grupo de ratones fue desafiado con una cepa EPEC. Una vez que la infección con este patovar cesó y los ratones ya no eliminaban el microorganismo por materia fecal, se llevó a cabo un segundo desafío con una cepa AE-STEC. Dentro de este grupo, 8/11 ratones no manifestaron signos, mientras que los 3 restantes mostraron signos leves. Los grupos control que fueron desafiados con cepas AE-STEC sin exposición previa a EPEC mostraron signos clínicos más severos. Los ratones desafiados desarrollaron anticuerpos contra intimina y EspB. Incluso se detectaron anticuerpos que reconocieron la proteína intimina de AE-STEC previo desafío con esta cepa, sugiriendo inmunidad cruzada entre ambos patovares. En aquellos ratones en donde las cepas EPEC colonizaron el intestino de forma persistente, las cepas AE-STEC no fueron capaces de adherirse.

1.5. Patovares híbridos de *Escherichia coli*

La capacidad de las distintas cepas de *E. coli* de adquirir factores de virulencia es continua, lo que permite que se generen cepas híbridas que comparten marcadores de patogenicidad. Un ejemplo de ello es la cepa EAEC O104:H4, detectada en Alemania en 2011. Esta cepa adquirió el fago que codifica para Stx2a y con él la capacidad de producir la toxina, generándose un híbrido EAEC/STEC. Esta cepa EAEC/STEC tiene la capacidad de colonizar efectivamente el intestino humano y al mismo tiempo producir toxina Shiga lo que la hace excepcionalmente virulenta (Bielaszewska y col., 2011). La adquisición del gen *stx* propio de cepas STEC, generó un brote con 3816 casos reportados que llamativamente afectaron a la población adulta, 845 de los cuales evolucionaron a SUH, y 54 murieron (Rasko y col., 2011; Scheutz y col., 2011; Frank y col., 2011).

La presencia de cepas híbridas EAEC/STEC asociadas a diarrea y a SUH se ha registrado en Argentina desde el 2005 y se ha asociado a los serotipos O59:NM [H19] y ONT:H4 (Rivas, 2016).

Por su parte Clements y col. (2012) identificaron otro híbrido, una cepa EIEC con perfil de adherencia difusa (EIEC/DAEC), a la que denominaron *E. coli* adherente invasiva, mientras que Farfán García y col. (2015) identificaron dos cepas EIEC con adherencia agregativa y formación de biopelículas similares a EAEC a partir de muestras de diarrea en Colombia.

Asimismo, Nyholm y col. (2015) detectaron 3 híbridos ETEC/STEC, concluyendo que los genes de virulencia pueden coexistir en las cepas originando diferentes linajes filogenéticos.

1.6. Síndrome urémico hemolítico y diarreas agudas en Argentina

En Argentina el SUH es endémico, y su incidencia es la más alta a nivel mundial. Se reportan 12 a 14 casos cada 100.000 habitantes menores de 5 años, y en la última década se reportaron alrededor de 400 casos por año. El SUH es la principal causa de falla renal aguda en niños y la segunda causa de falla renal crónica, y es responsable del 20% de los trasplantes renales en niños y adolescentes (Amigo y col., 2015). Considerando los datos de INCUCAI, se observa en el período 2005-6 que el SUH es responsable del 9% de los trasplantes renales en el grupo etario hasta los 18 años (INCUCAI-SAN, 2006). La tasa de mortalidad de este síndrome es del 5% (Rivero y col., 2010).

Con respecto a SUH, hasta la semana epidemiológica (SE) 17 del año 2018, se brinda información proveniente de tres estrategias formales de vigilancia del Sistema Nacional de Vigilancia de la Salud (SNVS): módulo de Vigilancia Clínica, módulo de Vigilancia por Laboratorios y módulo de Unidades Centinela. A partir de la SE18/2018 el antiguo SNVS fue reemplazado por el SNVS 2.0 el cual integra las tres estrategias en un mismo sistema de información (Boletín Integrado de Vigilancia 459, 2019), permitiendo una lectura de datos más rápida y depurada.

Los casos denunciados al SNVS oscilan entre 350 y 500 por año, con marcada estacionalidad al registrarse aumento de casos durante el verano. El grupo etario más afectado es el de niños menores a 5 años de edad, y la mayor cantidad de casos se concentran en el grupo de 2 a 4 años. Las tasas de notificaciones más altas (definidas como número de casos cada 100.000 habitantes) se observan en los niños de un año. Con respecto al sexo del individuo afectado, suelen predominar los casos de sexo femenino, pero sin diferencias significativas por sexo (Boletín Integrado de Vigilancia 222, 2014).

La mayor casuística de esta enfermedad se observa en la región centro del país (región con mayor cantidad de habitantes), que incluye a las provincias de Buenos Aires, Córdoba, Santa Fe y Entre Ríos. No obstante, las mayores tasas de notificación se encuentran en la región sur e incluye a las siguientes provincias: La Pampa, Neuquén, Río Negro, Chubut, Santa Cruz y Tierra del Fuego (TDF), Antártida e Islas del Atlántico Sur, destacándose históricamente Chubut y la isla de TDF. Entre 2010 y 2013 las tasas de notificación de esta región sur mostraron un descenso, para volver a subir en el año 2015. En este año se registraron 337 casos de SUH en Argentina (2,07 casos cada 100.000 habitantes), con las mayores tasas de notificación en la región sur del país, La tasa de TDF en el año 2015 fue de 1,97 casos cada 100.000 habitantes (Boletín Integrado de Vigilancia 335, 2016).

Ampliando la información, para el periodo 2006 - 2015 la mediana de casos de SUH fue

de 428 casos por año. El año 2008 presentó el número más alto de casos del período (543), mientras que 2013 presentó el más bajo (319). El 39% de los casos notificados se concentran en el grupo entre los 2 y 4 años, seguidos por el grupo de 1 año con 27% de los casos. La mayor tasa de notificación correspondió al grupo de 1 año con 15 casos cada 100.000 habitantes/año (Boletín Integrado de Vigilancia 335, 2016).

Durante 2016 se registraron 356 casos de SUH, 287 de los cuales se encontraron en el grupo de niños menores de 5 años. Las mayores tasas de notificación ocurrieron en el grupo de un año, con 14 casos cada 100.000 habitantes. TDF presentó una tasa de notificación de 0,64 casos cada 100.000 habitantes (Boletín Integrado de Vigilancia 344, 2017).

Durante el 2017 hasta la SE48, se notificaron al SNVS 326 casos de SUH, el 40,5% de los cuales se concentró en el grupo de 2 a 4 años y la tasa específica de notificación más alta se observó en el grupo de 1 año con 11,8 casos cada 100.000 habitantes. La tasa de notificación más elevada del país correspondió a la provincia de TDF (4,98 cada 100.000 habitantes) seguidos por Chubut, Ciudad Autónoma de Buenos Aires y Santa Cruz (2,04, 1,34 y 1,18 cada 100.000 habitantes respectivamente) (Boletín Integrado de Vigilancia 394, 2018).

Los últimos datos del año 2019 de acuerdo a lo notificado hasta el 23/07/2019, informan 215 casos de SUH. La incidencia acumulada hasta la SE30 asciende a 0,48 casos cada 100.000 habitantes. De los 215 casos notificados, 174 (81%) corresponden a menores de 5 años. En cuanto al análisis por regiones y provincias, puede observarse que, la tasa más elevada a nivel regional se observa una vez más en la región sur con 1,11 casos cada 100.000 habitantes y en la que todas las provincias a excepción de La Pampa presentan más de un caso cada 100.000 habitantes (Boletín Integrado de Vigilancia 459, 2019).

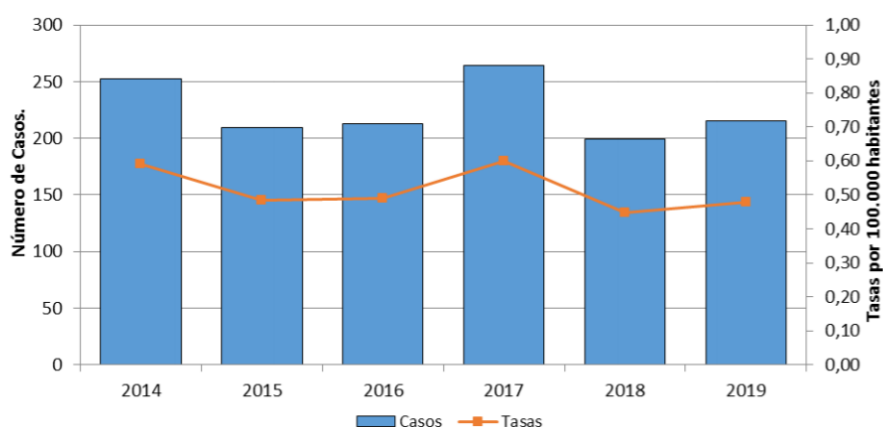


Figura 1. Casos y tasas de SUH (cada 100.000 habitantes). Argentina. Años

2014-2019 hasta SE30. (Boletín Integrado de Vigilancia 459, 2019).

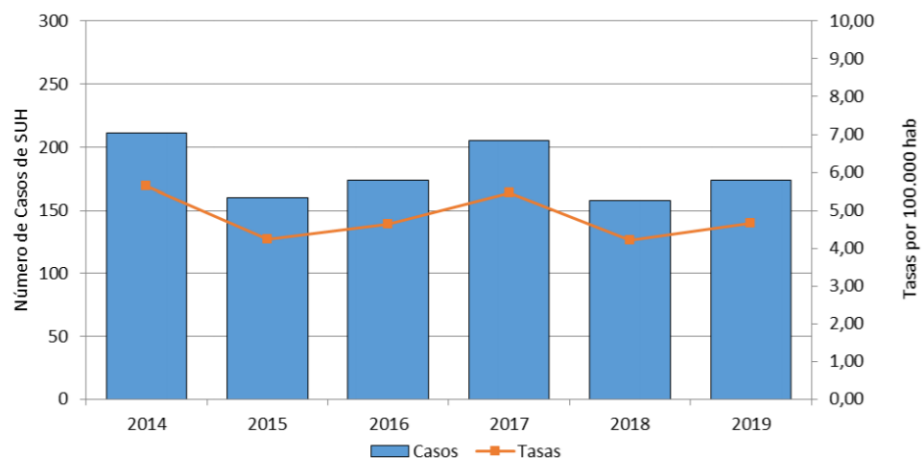


Figura 2. Casos y tasas notificadas de SUH en menores de 5 años. Argentina. Años 2014-2019 hasta SE30. (Boletín Integrado de Vigilancia 459, 2019).

Tabla 1. Casos y tasas de notificación de SUH por 100.000 habitantes según provincia de residencia. Argentina. (Boletín Integrado de Vigilancia 459, 2019).

Provincia	2014		2015		2016		2017		2018		Promedio 2014-2018	Mediana 2014-2018	2019		Diferencia de casos 2019
	Casos	Tasas	Casos	Tasas	Casos	Tasas	Casos	Tasas	Casos	Tasas			Casos	Tasas	
BUENOS AIRES	89	0,54	60	0,36	85	0,50	120	0,71	82	0,48	87	85	86	0,50	-1
CABA	58	1,90	31	1,01	13	0,42	39	1,27	16	0,52	31	31	18	0,59	-13
CORDOBA	12	0,34	26	0,73	33	0,92	29	0,80	21	0,57	24	26	20	0,54	-4
ENTRE RIOS	6	0,46	4	0,30	3	0,22	3	0,22	7	0,51	5	4	8	0,58	3
SANTA FE	15	0,45	18	0,53	17	0,50	22	0,64	10	0,29	16	17	15	0,43	-1
CENTRO	180	0,65	139	0,50	151	0,53	213	0,75	136	0,47	164	151	147	0,51	-16,8
MENDOZA	10	0,54	15	0,80	15	0,79	10	0,52	12	0,62	12	12	16	0,81	4
SAN JUAN	7	0,96	5	0,68	3	0,40		0,00	7	0,92	6	6	8	0,00	-6
SAN LUIS	2	0,43	2	0,42	3	0,62		0,00	5	1,01	3	2,5	1	0,20	-2
CUYO	19	0,62	22	0,71	21	0,67	10	0,32	24	0,75	19	21	17	0,52	-2,2
CORRIENTES	2	0,19	2	0,19	3	0,28	1	0,09		0,00	2	2	3	0,27	1
CHACO		0,00	1	0,09		0,00	1	0,09		0,00	1	1	3	0,25	2
FORMOSA		0,00	1	0,17	1	0,17	1	0,17		0,00	1	1	1	0,17	0
MISIONES	1	0,09		0,00	1	0,08	2	0,16		0,00	1	1	1	0,08	0
NEA	3	0,08	4	0,10	5	0,12	5	0,12	0	0,00	3	4	8	0,19	4,6
CATAMARCA	1	0,25	1	0,25	2	0,50		0,00		0,00	1	1		0,00	-1
JUJUY	1	0,14		0,00	3	0,41		0,00		0,00	2	2	1	0,13	-1
LA RIOJA	1	0,28		0,00	2	0,54		0,00		0,00	2	1,5	1	0,26	-1
SALTA	9	0,68	5	0,37	6	0,44	4	0,29	5	0,36	6	5	2	0,14	-4
SGO. DEL ESTERO	1	0,11	1	0,11	2	0,21	6	0,63	1	0,10	2	1	1	0,10	-1
TUCUMAN	5	0,32	1	0,06	1	0,06	2	0,12	4	0,24	3	2	6	0,36	3
NOA	18	0,34	8	0,15	16	0,30	12	0,22	10	0,18	12,8	12	11	0,20	-1,8
CHUBUT	7	1,26	11	1,94	7	1,21	10	1,70	9	1,50	9	9	8	1,31	-1
LA PAMPA	5	1,47	4	1,17	3	0,87		0,00	5	1,42	4	4,5	3	0,84	-1
NEUQUEN	7	1,15	8	1,29	4	0,64	6	0,94	5	0,77	6	6	7	1,07	1
RIO NEGRO	5	0,73	5	0,72	5	0,71	3	0,42	4	0,55	4	5	8	1,08	4
SANTA CRUZ	4	1,28	6	1,87	1	0,30	3	0,89	4	1,15	4	4	4	1,12	0
TIERRA DEL FUEGO	4	2,70	2	1,31		0,00	2	1,24	2	1,21	3	2	2	1,18	-1
SUR	32	1,21	36	1,33	20	0,73	24	0,86	29	1,02	28	29	32	1,11	3,8
Total general	252	0,59	209	0,48	213	0,49	264	0,60	199	0,45	227	213	215	0,48	-12

Referencia diferencia absoluta de casos

- Menor a -1 caso
- Entre -1 caso a 1 caso
- Mayor a 1 caso

Con respecto a las diarreas agudas, la mayor cantidad de casos también se registran en el centro del país, mientras que las mayores tasas acumuladas (cada 100.000 habitantes) se observan en el noroeste del país, seguidas por la región sur. Dentro de las provincias que integran la región sur, TDF presenta la mayor tasa acumulada de diarreas agudas. Al observar la distribución espacial de los casos en la provincia de TDF, vemos que éstos se concentran en el departamento de Ushuaia.

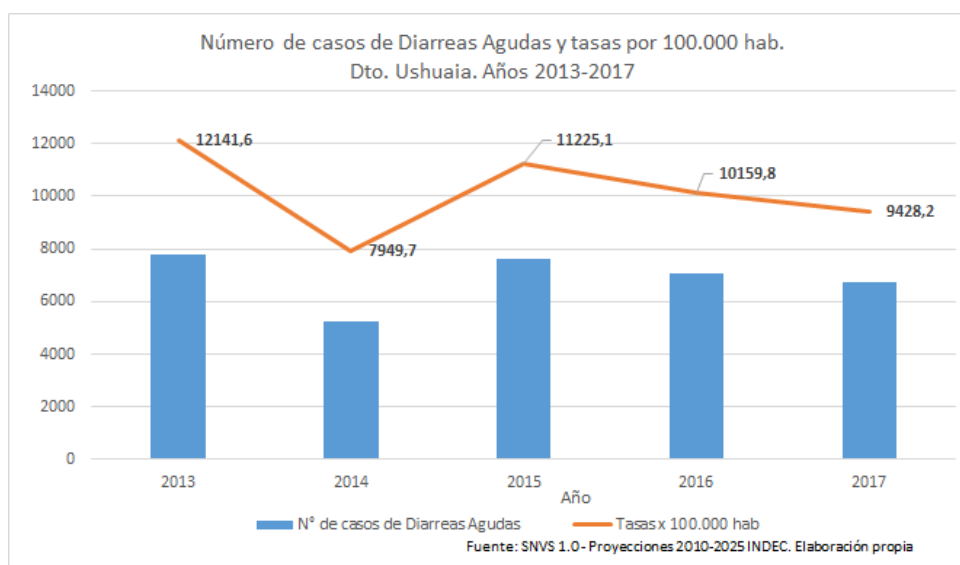


Figura 3. Tasas de diarreas agudas (por 100.000 hab.). Dto. Ushuaia.
Años 2013-2017

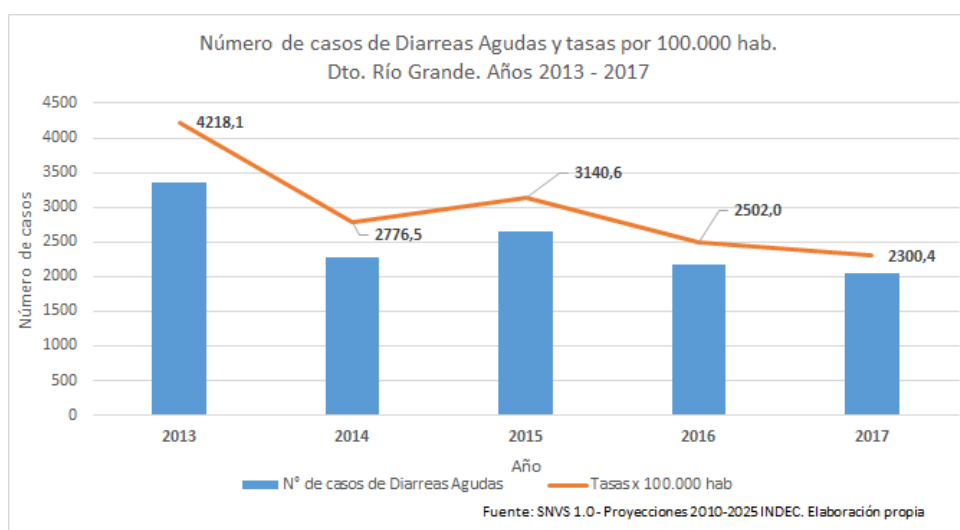


Figura 4. Tasas de diarreas agudas (por 100.000 hab.). Dto. Río Grande.
Años 2013-2017

En el 2015 se observó para el sur del país una tasa acumulada de 3475,85 casos de diarreas por cada 100.000 habitantes hasta la SE 40. TDF presentó la mayor tasa dentro de la región, con 5306,04 casos cada 100.000 habitantes (Boletín Integrado de Vigilancia 335, 2016). En 2016, la tasa acumulada de la región sur fue de 4166, mientras que en TDF se observaron 5715 casos cada 100.000 habitantes (Boletín Integrado de Vigilancia 344, 2017).

Si bien la mayor cantidad de casos se registran en el noroeste argentino, TDF constantemente se destaca presentando las mayores tasas acumuladas de notificación dentro de la región sur del país. Hasta la SE 28 de 2019, TDF presenta una tasa acumulada de 3822,5 (Boletín Integrado de Vigilancia 459, 2019).

Los datos observados y previamente señalados surgen del análisis de los reportes epidemiológicos de los años 2010-2019. El incremento de casos de SUH en TDF durante el período 2015 – 2017, sumado a las tasas de diarreas elevadas, motivó el presente estudio.

1.6 Tierra del Fuego

La Provincia de Tierra del Fuego, Antártida e Islas del Atlántico Sur es la provincia situada en el extremo sur de Argentina. Comprende tres ámbitos territoriales diferenciados: el sector oriental de la Isla Grande de Tierra del Fuego e islas adyacentes; las Islas Argentinas del Atlántico Sur; y la Antártida Argentina, incluyendo los archipiélagos de las Orcadas del Sur y las Shetland del Sur. La superficie total es de 1.002.445 km².

Más del 98% de la población reside en las ciudades. Los principales aglomerados urbanos son Ushuaia (U), la capital situada a orillas del Canal Beagle, y Río Grande (RG), ubicada junto a la desembocadura del río homónimo en el océano Atlántico. La tercera localidad urbana es Tolhuin (T), ubicada en el centro de la Isla Grande. Los resultados provisionales del Censo 2010, arrojaron una cifra de 129.004 habitantes en toda la provincia distribuidas en U 56.825 habitantes, RG 69.175 habitantes y T 3.004 habitantes (Dirección General de Estadísticas y Censos, 2014).

Debido a la latitud de la Provincia el clima se caracteriza en la zona sur por ser de tipo frío-oceánico, mientras que en la zona norte se encuentra un clima templado frío- subhúmedo, al cual se le suma la influencia del viento. La temperatura media de verano para ambas ciudades es de 10°C. En invierno, en cambio, ronda entre 0° C y 1° C (Sitio Oficial de Turismo de Tierra del Fuego, 2019).

Dentro de las actividades económicas podemos mencionar industria tecnológica, explotación de petróleo y gas, pesca, turismo, y producción ganadera ovina y bovina (Dirección General de Estadísticas y Censos, 2014).

Con respecto a producción bovina, los datos obtenidos a partir del Instituto Provincial de Análisis e Investigación, Estadística y Censos (IPIEC) muestran un descenso de la cantidad de bovinos faenados en la provincia por año, siendo los últimos datos del año 2012. En este año se registraron 793 bovinos faenados en Ushuaia, y 5560 en Río Grande. El último registro oficial de existencia ganadera es del año 2008. Se informaron en ese momento 480.745

cabezas ovinas y 40.900 cabezas bovinas (IPIEC, 2019).

La legislación del país limita los movimientos de ganado bovino entre norte y el sur de Argentina por el diferente status sanitario respecto a fiebre Aftosa (Resolución SENASA N° 5 del 6 de abril de 2001, Plan de Erradicación de la Fiebre Aftosa, Resolución SENASA N° 725 del 15 de noviembre de 2005, Resolución SENASA N° 82 del 15 de noviembre de 2013). TDF, que pertenece a la región Patagonia Sur de la regionalización de SENASA, es libre de Aftosa sin vacunación, y a su vez es libre de Brucelosis y de Tuberculosis bovina (SENASA Resolución 100/2011). Además, los intercambios con el resto del país también se ven afectados por las dificultades inherentes a las características geográficas de la isla.

Los escasos ingresos bovinos que existen son sobre todo animales de alto valor reproductivo. Marcos, A. (Marcos, 2019. Comunicación Personal), informó que en el año 2016 no hubo ingresos de animales en pie a la provincia de TDF. No es frecuente el ingreso a TDF de ganado en pie, solo carne proveniente del continente (sin hueso en aquellos casos que proviene del norte del Río Colorado). La carne que se consume es en parte importada (principalmente desde Trelew), y en parte proviene de la faena de la isla. En la zona norte de llanura, en Rio Grande, existe, además del ganado nativo en producción extensiva, un feedlot, que aseguran faena durante todo el año para consumo local.

En la Patagonia Argentina la provincia de TDF constituye entonces un modelo diferente, sin importación de animales en pie, con un área norte y sur respecto a la Cordillera de los Andes, y una situación climática muy diferenciada respecto al continente. Como mencionamos previamente, la tasa de SUH en Tierra del Fuego es una de las más altas del país, y junto a ella, las tasas generales de diarreas también presentan valores elevados. Esto podría explicarse de diferentes formas. En primer lugar, las restricciones en la importación de ganado en pie permiten considerar que el perfil de virulencia de las cepas circulantes en los reservorios de la región podría diferir respecto a la del continente y constituir un particular riesgo para la población. Las diferencias existentes con el resto del país también pueden involucrar factores sociales, culturales o faltas de control en la implementación de las Buenas Prácticas. Asimismo, debiera considerarse la relación entre las cepas EPEC y AE-STEC. La evolución de STEC está dada por la adquisición de numerosos factores de virulencia gracias a la transferencia horizontal de genes, mediada principalmente por fagos. Se cree que la cepa AE-STEC O157:H7 surgió a partir de una cepa aEPEC O55:H7, que adquirió los genes *stx1* y *stx2* por transducción (Vanaja y col., 2013). Estos patovares incluso pueden compartir serogrupos de importancia clínica, ya que O26 y O111 pueden incluir tanto cepas EPEC como STEC (Clements y col., 2012). Teniendo en cuenta también la inmunidad cruzada observada entre ambos patovares (Calderon Toledo y col., 2011), la detección de una baja prevalencia de EPEC podría ser un factor explicativo de una menor exposición de la población a

inmunógenos con efecto protector respecto a cepas AE-STECC presentes en el ganado.

Numerosos estudios en bovinos detallan las características de las cepas STECC aisladas de animales en pie; sin embargo, la relación entre la prevalencia de STECC y otros patovares de *E. coli* en reservorios y fuentes de infección en nuestro país ha sido poco estudiada. Dado que se ha demostrado que EPEC provee una inmunidad cruzada respecto a AE-STECC (Parissi Crivelli y col., 2000; Calderon Toledo y col., 2011), considerar la relación que hay entre la prevalencia de AE-STECC y EPEC tanto en reservorios como en fuentes de infección resulta de importancia.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2. HIPÓTESIS

Este trabajo propone como hipótesis que la alta prevalencia de SUH registrada en Tierra del Fuego obedece a características ecobiológicas de los reservorios de la isla. Los bovinos, población nativa sin ingreso de animales en pie del continente, presentan una alta prevalencia de AE-STECS y una baja prevalencia de EPEC.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

- Contribuir a la comprensión de la epidemiología de SUH y de las infecciones por STEC en Tierra del Fuego.
- Contribuir al establecimiento de un modelo predictivo-explicativo de la transmisibilidad para la enfermedad.

3.2. Objetivos particulares

- Determinar la portación de STEC (STECS-LEE negativo / AE-STECS) y EPEC en muestras de bovinos de Tierra del Fuego destinados a faena.
- Evaluar el perfil de virulencia de las cepas STEC (STECS-LEE negativo / AE-STECS) y EPEC aisladas.
- Analizar la relación entre los patovares en estudio aislados de bovinos de Tierra del Fuego.

MATERIALES Y MÉTODOS

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Obtención de muestras

Se realizó un estudio epidemiológico trasversal de tipo observacional para la detección de cepas STEC (STEC-LEE negativo / AE-STEC) y EPEC en bovinos de Tierra del Fuego (TDF).

El tamaño muestral se estableció en 126 animales por lugar de muestreo (dos playas de faena, una en Ushuaia y otra en Río Grande), considerando una distribución normal estandarizada de $Z= 1,96$, con una confianza del 95%; precisión (e)= 0,05, y prevalencia de STEC y EPEC en el mismo animal (p) obtenida por bibliografía= 0,09 (Orden y col., 2002).

El muestreo fue dirigido por accesibilidad en playa de faena durante julio de 2016. La población en estudio abarcó a los bovinos de TDF.

Se definió como criterio de inclusión a todo animal bovino que llegó a playa de faena en julio de 2016, y como criterio de exclusión a todo animal no bovino que llegó a playa de faena en ese período.

Al momento del muestreo se registraron las siguientes variables: nombre estancia (variable cualitativa nominal), localidad (variable cualitativa nominal, categorizada en RG y U) y tipo de cría (variable cualitativa nominal categorizada en feedlot (FL) y campo (C)).

Por cada animal se tomó una muestra para diagnóstico bacteriológico mediante hisopado rectal que fue remitido al laboratorio en medio Stuart y refrigerado para su procesamiento.

4.2. Procesamiento de las muestras

Las muestras se analizaron siguiendo dos rutas, una para detección de EPEC y STEC no-O157, y otra diferente para la detección de STEC O157, de acuerdo al algoritmo que se observa en la **figura 1**. Ambas rutas diagnósticas (EPEC/STEC no-O157 y STEC O157) se realizaron en paralelo. La primera ruta involucra cepas STEC-LEE negativo / AE-STEC, y la segunda ruta exclusiva para STEC O157 generalmente corresponde a un serogrupo AE-STEC, aunque se describen excepciones (Stephan y col., 2009).

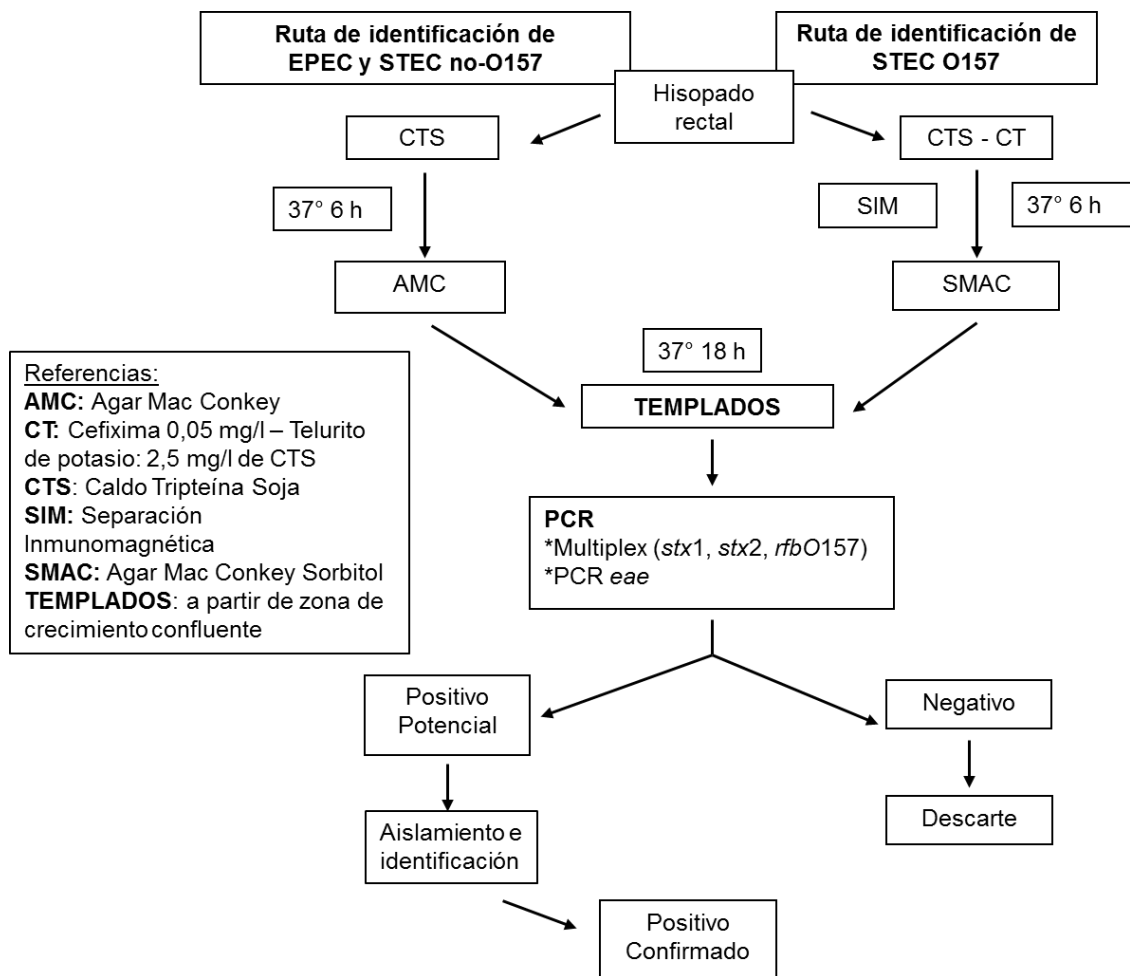


Figura 5. Algoritmo para detección de STEC y EPEC

4.2.1. Ruta EPEC y STEC no-O157

A partir de la muestra se realizaron precultivos en caldo tripteína soja (CTS) que fueron incubados durante 6 h a 37°C. Posteriormente los mismos fueron sembrados por agotamiento en superficie en agar Mc Conkey (AMC), e incubados durante 24 h a 37°C. De la zona de crecimiento confluyente se obtuvo material para realizar los templados para PCR (procedimiento detallado en anexo).

4.2.2. Ruta STEC O157

Para la detección de STEC O157 las muestras fueron sembradas en caldo tripteína soja con Cefixima-Telurito (CTS-CT). A partir de los precultivos se realizó separación inmunomagnética (SIM), y las suspensiones obtenidas fueron sembradas en agar Mc Conkey con sorbitol (SMAC). Se incubó durante 18 h a 37 °C. A partir de las colonias sorbitol negativas y de la zona de confluencia se obtuvo el material para realizar los templados para PCR.

4.2.2.1. Separación inmunomagnética anti-O157

Esta técnica se fundamenta en la utilización de anticuerpos anti-O157 para una detección más sensible de STEC O157. Los anticuerpos purificados se encuentran unidos covalentemente a la superficie de perlas esféricas polimagnéticas de poliestireno.

Se colocó un ml del precultivo en CTS-CT junto con 20 µl de inmunoperlas anti-*E. coli* O157 (Neogen®) en tubos de 2 ml y se incubó durante 30 min en agitación rotatoria. Las inmunoperlas unidas al antígeno, en caso de estar presente en la muestra, se concentraron utilizando un imán de tierras raras (gradilla para inmunocaptura, Life Tech®) durante 10 min. Las perlas migraron hacia la cara del tubo en contacto con el imán formando un “botón”, permitiendo descartar el líquido de la muestra con pipeta.

Se realizaron 3 ciclos de lavado-concentración, agregando 1 ml de PBS-tween 20 0,05% (anexo). Por último se resuspendieron las perlas en 100 µl de la solución de lavado, y se sembraron 50 µl en SMAC para la recuperación de *E. coli* O157.

4.2.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Esta técnica nos permite amplificar un determinado fragmento de ADN utilizando cebadores específicos para su detección. Se realizó tamizaje por PCR de los genes *stx1* y *stx2* como marcadores de STEC (Leotta y col., 2005), y se consideró el gen *eae* como marcador de EPEC (Blanco y col., 2004). Ambos grupos de marcadores deben estar presentes para clasificar a una cepa como AE-STECS.

4.2.3.1. PCR múltiple

Para la detección de cepas STEC se realizó PCR múltiple para la detección de *stx1*, *stx2* y *rfbO157* (Leotta y col, 2005).

Tabla 2. Mezcla de reactivos para PCR múltiple

	Concentración de trabajo del reactivo	Concentración de reactivo en la mezcla	Volumen una determinación (µl)
H ₂ O			24,36
<i>Buffer</i> *	5x	1x	10
dNTPs c/u	10 Mm	0,2 Mm	1
<i>stx1a</i>	10 µM	0,6 µM	3
<i>stx1b</i>	10 µM	0,6 µM	3
<i>stx2a</i>	10 µM	0,12 µM	0,6
<i>stx2b</i>	10 µM	0,12 µM	0,6
<i>rfbO157f</i>	10 µM	0,12 µM	0,6
<i>rfbO157r</i>	10 µM	0,12 µM	0,6
Cl ₂ Mg*	*	1,5 mM	*
Taq	5 U/µl	1,20 U	0,24
Volumen final = 44 µl de mezcla de reactivos + 6 µl de templado = 50 µl			

Referencia: En los ensayos se utilizó GoTaq (Promega), cuyo *buffer* contiene 7,5mM Cl₂Mg, no se adicionó Cl₂Mg, la concentración final fue de 1,5 mM de Cl₂Mg.

La PCR se realizó en un termociclador (Mastercycler Gradient, Eppendorf) bajo las siguientes condiciones: temperatura inicial de 94 °C durante 5 min, seguido de 30 ciclos de 94 °C durante 30 s, 56 °C durante 30 s y 72 °C durante 30 s y un paso final de 72 °C durante 7 min, manteniéndose a 4 °C hasta su posterior análisis. Los cebadores utilizados se detallan

en la **tabla 3**.

4.2.3.2. PCR eae

Para la detección de cepas eae+ se realizó PCR (Blanco y col., 2004).

Tabla 3. Mezcla de reactivos para PCR eae

	Concentración de trabajo del reactivo	Concentración de reactivo en la mezcla	Volumen una determinación (µl)
H ₂ O			15,15
<i>Buffer</i>	10x	1x	2,5
dNTPs c/u	10 mM	0,2 mM	0,5
<i>eae1</i>	10 µM	0,12 µM	0,3
<i>eae2</i>	10 µM	0,12 µM	0,3
Cl ₂ Mg	25 mM	2 mM	2
Taq	5 U/µl	1,25U	0,25
Volumen final = 21 µl de mezcla de reactivos + 4 µl de templado = 25 µl			

Referencia: En los ensayos se utilizó Taq (INBIO).

La PCR se realizó en un termociclador (Mastercycler Gradient, Eppendorf) bajo las siguientes condiciones: temperatura inicial de 94 °C durante 5 min, seguido de 30 ciclos de 94 °C durante 45 s, 62 °C durante 30 s y 72 °C durante 30 s y un paso final de 72 °C durante 7 min, manteniéndose a 4 °C hasta su posterior análisis. Los cebadores utilizados se detallan en la **tabla 3**.

Tabla 4. Cebadores utilizados para la detección de los marcadores de cepas STEC y EPEC

Cebador	Secuencia	Amplicón	Referencia
<i>stx1a</i>	GAAGAGTCCGTGGGATTACG	130	Leotta y col., 2005
<i>stx1b</i>	AGCGATGCAGCTATTAATAA		
<i>stx2a</i>	TTAACCACACCCCACCGGGCAGT	346	Leotta y col., 2005
<i>stx2b</i>	GCTCTGGATGCATCTCTGGT		
<i>rfbO157-f</i>	CGGACATCCATGTGATATGG	259	Leotta y col., 2005
<i>rfbO157-r</i>	TTGCCTATGTACAGCTAATCC		
<i>eae-f</i>	GGAACGGCAGAGGTTAATCTGCAG	346	Blanco y col., 2004
<i>eae-r</i>	GGCGCTCATCATAGTCTTTC		

Diez µl de cada uno de los productos obtenidos por PCR fueron sometidos a electroforesis en un gel de agarosa al 2% para separar los distintos fragmentos de ADN de acuerdo a su carga y peso molecular. La electroforesis se realizó en buffer tris bórico EDTA (TBE) 0,5x. Luego se realizó tinción con bromuro de etidio y finalmente se observó con luz UV.

La cepa de referencia de *E. coli* para realizar PCR de tamizaje fue la siguiente:

- D2653 (EDL 933): *E. coli* O157:H7 proveniente del Statens Serum Institut. Perfil genotípico: *stx1a/stx2a/astA/eae/ehxA*.

En aquellas muestras en las que se logró detectar el gen de interés a partir de la zona de confluencia, se continuó con el análisis de colonias aisladas. Se buscaron los genes marcadores en hasta 50 unidades formadoras de colonias (UFC).

A partir de los resultados obtenidos los animales se clasificaron en tres categorías:

- Negativos: los genes de interés no estaban presentes o su presencia estaba por debajo del límite de detección de los ensayos.
- Positivo potencial: se detectaron por PCR genes de interés partir de zona de confluencia, pero no fue posible aislar la cepa *stx+* y/o *eae+* tras analizar 50 colonias compatibles con *E. coli*.
- Positivos: se detectaron por PCR los genes de interés, y se logró aislamiento e identificación de la/s cepa/s STEC y/o EPEC.

Según la combinación de marcadores genéticos detectados para cada aislamiento, las cepas fueron categorizadas como:

- AE-STEC: incluye las cepas STEC O157 (*stx/eae*) y STEC no-O157 (*stx/eae*)
- STEC-LEE negativo: incluye las cepas STEC *stx* (*eae-*)
- EPEC: incluye las cepas *eae* (*stx-*)

4.3 Caracterización de cepas aisladas

Las cepas STEC y EPEC aisladas fueron caracterizadas fenotípicamente (morfología, afinidad tintorial, movilidad) y se utilizaron pruebas bioquímicas clásicas para su identificación: oxidasa, catalasa, oxido-fermentación de la glucosa, producción de indol, vías fermentativas ácido mixta (Rojo de Metilo) o butilenglicólica (Voges Proskauer), citrato de Simmons, fermentación de azúcares (lactosa, sorbitol y sacarosa) y producción de sulfhídrico.

4.4. Cepas STEC

4.4.1. Subtipificación de toxina Shiga

El estudio de los subtipos de *stx* de las cepas STEC aisladas se realizó de acuerdo a la metodología propuesta por (Scheutz y col., 2012) con algunas modificaciones. La subtipificación de *stx1* se realizó mediante 3 PCR individuales (*stx1a*, *stx1c* y *stx1d*), mientras que para la subtipificación de *stx2* se realizaron 7 PCR individuales (*stx2a*, *stx2b*, *stx2c*, *stx2d*, *stx2e*, *stx2f* y *stx2g*). Todos los protocolos de subtipificación fueron validados en el laboratorio (esquema de calificación externa EQA4 y EQA5, Statens Serum Institut).

Diez µl de cada uno de los productos obtenidos en cada una de las PCR de

subtipificación de *stx1* y *stx2* fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 2% durante 30 min y teñidos con bromuro de etidio para su posterior evaluación con luz UV.

Los tiempos y reactivos necesarios para realizar estas PCR figuran en el anexo (**tablas 5 a 10**), y los cebadores utilizados se detallan en la **tabla 11**.

Las cepas control provenientes del Statens Serum Institut fueron las siguientes:

- D2653 (EDL 933): *E. coli* O157:H7. Perfil genotípico: *stx1a/stx2a/astA/eae/ehxA*.
- D3602 (DG131/3): *E. coli* O174:H8. Perfil genotípico: *stx1c/stx2b*.
- D3522 (MHI813): *E. coli* O8:K85ab:Hrough. Perfil genotípico: *stx1d/eae*.
- D3431 (F35790): *E. coli* O157:H7. Perfil genotípico: *stx2c/astA/eae/ehxA*.
- D4134 (1112R15035): *E. coli* O166:H15. Perfil genotípico: *stx2d*.
- D3648 (S1191): *E. coli* O139:K12:H1. Perfil genotípico: *stx2e*.
- D3546 (T4/97): *E. coli* O128ac:H2. Perfil genotípico: *stx2f/astA/eae/bfpA*.
- D3509 (7v): *E. coli* O2:H25. Perfil genotípico: *stx2g/astA/ehxA/estA*.

Tabla 11. Cebadores utilizados para la subtipificación de toxina Shiga

Cebador	Secuencia	Amplificación
<i>stx1a</i> -F	CCTTTCCAGGTACAACAGCGGTT	478
<i>stx1a</i> -R	GGAAACTCATCAGATGCCATTCTGG	
<i>stx1c</i> -F	CCTTTCCTGGTACAACACTGCGGTT	252
<i>stx1c</i> -R	CAAGTGTTGTACGAAATCCCCTCTGA	
<i>stx1d</i> -F	CAGTTAATGCGATTGCTAAGGAGTTTACC	203
<i>stx1d</i> -R	CTCTTCCTCTGGTTCTAACCCCATGATA	
<i>stx2a</i> -F2	GCGATACTGRGBACTGTGGCC	349 – 347
<i>stx2a</i> -R3	CCGKCAACCTTCACTGTAAATGTG	
<i>stx2a</i> -R2	GCCACCTTCACTGTGAATGTG	
<i>stx2b</i> -F1	AAATATGAAGAAGATATTTGTAGCGGC	251
<i>stx2b</i> -R1	CAGCAAATCCTGAACCTGACG	
<i>stx2c</i> -F1	GAAAGTCACAGTTTTTATATACAACGGGTA	177
<i>stx2c</i> -R2	CCGGCCACYTTTACTGTGAATGTA	
<i>stx2d</i> -F1	AAARTCACAGTCTTTATATACAACGGGTG	179 – 280
<i>stx2d</i> -R1	TTYCCGGCCACTTTTACTGTG	
<i>stx2d</i> -O55-R	TCAACCGAGCACTTTGCAGTAG	
<i>stx2d</i> -R2	GCCTGATGCACAGGTAAGGAC	
<i>stx2e</i> -F1	CGGAGTATCGGGGAGAGGC	411
<i>stx2e</i> -R2	CTTCCTGACACCTTCACAGTAAAGGT	
<i>stx2f</i> -F1	TGGGCGTCATTCACTGGTTG	424
<i>stx2f</i> -R1	TAATGGCCGCCCTGTCTCC	
<i>stx2g</i> -F1	CACCGGGTAGTTATATTTCTGTGGATATC	573
<i>stx2g</i> -R1	GATGGCAATTCAGAATAACCGCT	

Referencia: Scheutz y col., 2012.

4.4.2. Producción de toxina Shiga

Para detectar la producción de toxina Shiga se utilizó el inmunoensayo enzimático rápido de membrana Shiga Toxin Quick Check™. El test emplea anticuerpos específicos frente a toxina Shiga 1 y 2, detectando su producción de forma cualitativa, simultánea y diferenciada.

A partir de las indicaciones del proveedor y siguiendo las modificaciones previamente analizadas con la cepa patrón EDL933 por Blanco Crivelli y col., (2018), se sembraron las cepas de interés en CTS, se cultivaron overnight para lograr la fase logarítmica de crecimiento y se evaluó la producción de toxina (Blanco Crivelli y col., 2018).

4.5. Cepas EPEC

4.5.1. Detección del gen *bfpA*

Para la cepa EPEC aislada, se realizó la búsqueda por PCR del gen *bfpA* que codifica para la producción de la fimbria tipo IV (Gunzburg y col., 1995). Los tiempos y reactivos necesarios para realizar esta PCR figuran en el anexo (**tabla 12**), y los cebadores utilizados se detallan en la **tabla 13**.

Tabla 13. Cebadores utilizados para la identificación del gen *bfpA*

Cebadores	Secuencia	Amplicón (bp)
<i>bfpAa</i>	AATGGTGCTTGCGCTTGCTGC	326
<i>bfpAb</i>	GCCGCTTTATCCAACCTGGTA	

Referencia: Gunzburg y col., 1995.

4.5.2. Ensayos de adhesión en cultivo celular

4.5.2.1 Identificación de patrón de adhesión

Se realizaron ensayos en cultivo celular de la línea HeLa (Scaletsky y col., 1984; Gomes y col., 2004). Para realizar estos ensayos y enfrentar los microorganismos con las células, se utilizaron placas de 24 pozos (**figura 6**). En cada pozo se colocó una lámina sobre la que formaría la monocapa.

En primera instancia se colocaron células junto con medio de mantenimiento (anexo) en botellas pequeñas para cultivo (**figura 6**). Se incubó 48 h a 37°C con 5% dióxido de carbono con el fin de que la monocapa desarrolle en su totalidad. Posteriormente se evaluó integridad celular mediante microscopio óptico.

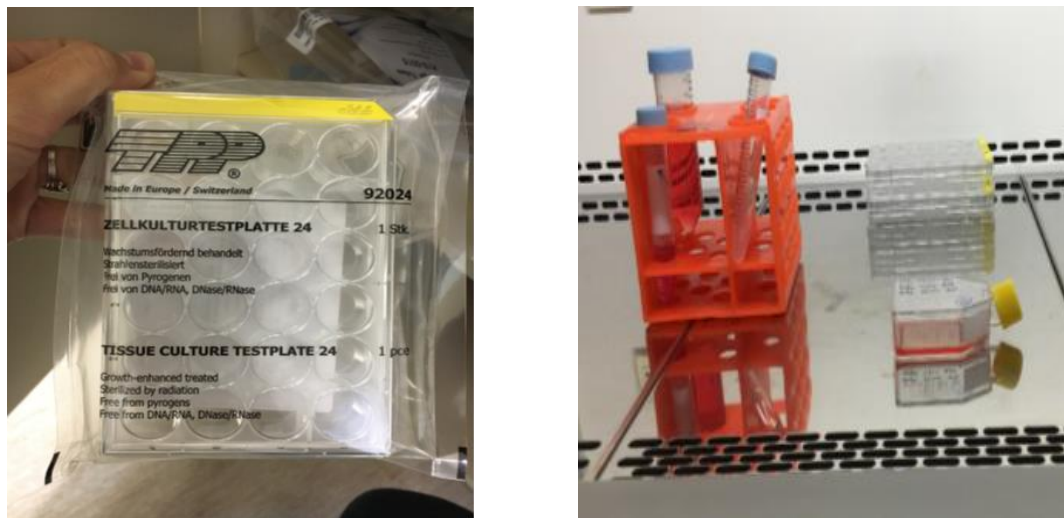


Figura 6. Placa de 24 pozos y botella para cultivo celular.

A partir de la botella se realizaron lavados con tripsina para recuperar las células, se resuspendieron en medio de mantenimiento, y finalmente se colocó un ml por pozo con una concentración de $1 \cdot 10^5$ células por ml. El recuento de células se realizó con cámara de Neubauer. Se buscó que las células cubrieran el 80% de la superficie de la lámina, para poder evaluar correctamente los patrones de adhesión.

Para enfrentar la cepa de *E. coli* con las células se siguió el algoritmo indicado en la **figura 7**. Se retiró el medio de mantenimiento y se realizaron tres lavados con 1 ml de PBS. Estas maniobras debieron ser realizadas con precaución para no afectar la monocapa celular. Posteriormente se colocó 1 ml de medio de ensayo por pozo (anexo). Finalmente se colocaron 20 μ l de las cepas de interés cultivadas overnight en caldo Luria Bertani. Cada cepa se sembró por duplicado. Se respetaron los mismos pasos para la siembra de las cepas control.

Los controles utilizados fueron los siguientes:

- Células HeLa control
- E2348 adherencia localizada (LA) (Scaletsky y col., 2010)
- C1845 adherencia difusa (LAL) (Cantey y Moseley, 1991)
- O42 adherencia agregativa (AA) (Edwards y col., 2011)
- HB101 no adherente (Saldaña y col., 2009)

Los ensayos fueron realizados en dos tiempos de incubación de 3 y 6 h, a 37°C, teniendo

en cuenta que las cepas aEPEC suelen demorar más en adherirse. En los ensayos de 6 h, se realizaron tres lavados con PBS y recambio del medio de ensayo a las 3 h, para evitar su acidificación por el crecimiento bacteriano.

Finalizado el tiempo de incubación, se realizaron tres lavados con PBS y se fijó la capa celular junto con los microorganismos con metanol por 20 minutos. Se realizó tinción con May Grünwald Giemsa (anexo), y se retiraron las láminas para observar al microscopio óptico el patrón de adhesión en la monocapa.

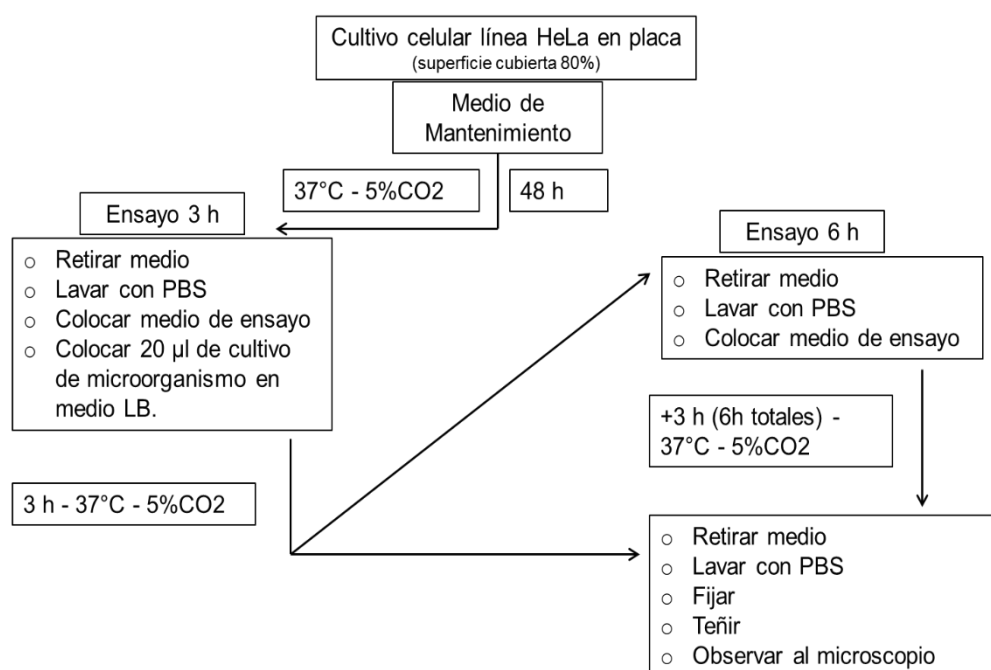


Figura 7. Algoritmo del ensayo de adhesión a cultivo celular en células HeLa.

Referencias: 1- Medio de mantenimiento: Dulbeccos' modified Eagles médium (DMEM) con 15mm/l HEPES, 2 g/l de bicarbonato, 10% suero fetal bovino y aminoácidos. 2- Medio de ensayo: DMEM con 15mm/l de HEPES, 0,34g/l de bicarbonato, 2% suero fetal bovino y manosa. 3- Medio LB: Luria Bertani.

4.5.2.2. Determinación de lesión A/E

Para evaluar la capacidad de la cepa aislada de producir lesión A/E, se observaron las células mediante tinción FAS (del inglés fluorescent actin stain). En un primer momento, se enfrentaron células HeLa y las cepas a evaluar de forma similar a la descrita para los ensayos de adhesión celular (**figura 7**). En esta técnica se agregó 10% de suero fetal bovino al medio de ensayo (anexo).

Una vez transcurrido el tiempo de incubación de 3h para este tipo de ensayo, se realizó fijación con una solución de formaldehído al 3% por 10 minutos. Luego se realizaron tres lavados con PBS, y se colocó 1 ml de Tritón (solución comercial Tritón X-100 a 0,1%) en cada pozo durante 4 minutos. Posteriormente se realizaron nuevamente tres lavados con PBS, y se colocaron 15 µl de faloidina diluida (compuesto fluorescente). Se colocó la placa de ensayo en la oscuridad por 30 minutos en cámara húmeda. Finalmente se realizaron en oscuridad otros tres lavados con PBS de 10 minutos de duración cada uno, se retiraron las láminas y se montaron en un portaobjeto con glicerol para observar al microscopio de fluorescencia.

El compuesto fluorescente utilizado (faloidina) tiene afinidad por la actina del citoesqueleto y pone en evidencia su desorganización. Es importante realizar la fijación previa a la tinción con formaldehído, ya que el metanol afecta la estructura de la actina.

4.6. Identificación de patovares híbridos

En las cepas aisladas se evaluó la presencia de patovares híbridos utilizando los siguientes marcadores: *aaIC* (Boisen y col., 2011) y *aagR* (Wieler y col., 2011) para cepas EAEC, *elt* y *estA* como marcador de ETEC (Itoh y col., 1992), *daaE* marcador de DAEC (Vidal y col., 2005), *invE* marcador de EIEC (Itho et al., 1992). Las características de estas PCRs y los cebadores utilizados se detallan en el anexo (**tablas 14 a 19**).

4.7. Detección de la presencia de enterohemolisina Calcio dependiente

Se realizó PCR en busca del gen *ehxA* que codifica para la producción de la enterohemolisina calcio dependiente (Paton y Paton, 2002). Los tiempos y reactivos necesarios para realizar esta PCR figuran en el anexo (**tabla 20**), y los cebadores utilizados se detallan en la **tabla 21**.

Tabla 21. Cebadores utilizados para la identificación del gen *ehxA*

Cebador	Secuencia	Amplicón
<i>ehxA-f</i>	GCATCATCAAGCGTACGTTCC	534
<i>ehxA-r</i>	AATGAGCCAAGCTGGTTAAGCT	

Posteriormente, se evaluó la producción fenotípica de esta enterohemolisina en las cepas aisladas mediante siembra en medios de cultivo agar base triptosa con glóbulos rojos lavados (AGRL, con agregado de Cl₂Ca 1M) y agar con glóbulos rojos sin lavar (AGRSL),

utilizando sangre desfibrinada de ovino (anexo). Se sembraron las cepas de interés y las cepas control en ambos medios. Se cultivaron a 37°C, observándose los cultivos a las 3 y a las 18 h. Las condiciones de ensayo se homologaron a las propuestas en el 5º Esquema Externo de Aseguramiento de Calidad para la tipificación de *Escherichia coli* Verotoxigénica (VTEC) & Other Diarrhoeagenic *E. coli* 2012-2013 (Statens Serum Institut, Division of Diagnostics and Infection Control). La presencia de hemólisis a las 3 h o en la placa de AGRSL se atribuye a una α -hemolisina genérica. Como control positivo se utilizó la cepa FF6 *E. coli* O26:H11 con perfil genotípico *stx2a/eae/ehxA*, y como control negativo SS19 *E. coli* O166:H15 con perfil genotípico *stx2d/eltA*.

4.8. Susceptibilidad a antimicrobianos

Se evaluó la susceptibilidad a antibióticos de las cepas de interés de acuerdo a las normas establecidas por el CLSI (Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 2018). Se utilizaron los siguientes antibióticos: Amikacina 30 μ g (AK), Ampicilina 10 μ g (AMP), Ciprofloxacina 5 μ g (CIP), Cloranfenicol 30 μ g (C), Gentamicina 10 μ g (CN), Acido Nalidíxico 30 μ g (NA), Norfloxacina 10 μ g (NOR), Estreptomicina 10 μ g (S), Tetraciclina 30 μ g (TE) y Trimetoprima-sulfametoxazol 25 μ g (SXT), colocando no más de seis discos por placa de cultivo (**figura 8**) (INEI-ANLIS, 2018).

Para evaluar resistencia a Colistina (COL), se utilizó el método COLISTIN AGAR-SPOT, de acuerdo a lo indicado en el protocolo de antimicrobianos del INEI-ANLIS (2017).

Se consideró multiresistente a toda cepa que resultó resistente a más de tres familias diferentes de antibióticos.

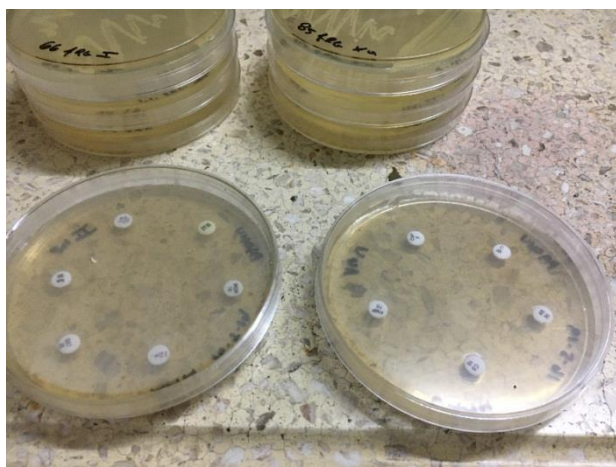


Figura 8. Ensayos de susceptibilidad.

En aquellas cepas que resultaron resistentes a Ampicilina se realizaron nuevas determinaciones con los siguientes antibióticos: Amoxicilina – clavulánico 30 µg (AMC), Cefotaxime 30 µg (CTX), Cefotaxima - Clavulánico 30 µg (CTX-C), Ceftazidima 30 µg (CAZ), Meropenem 10 µg (MER) e Imipenem 10 µg (IMI), para evaluar fenotípicamente la presencia de betalactamasas de espectro extendido (BLEE, AmpC y KPC). Se realizaron antibiogramas por difusión comparando resistencia a CTX y CTX-C (se considera resultado positivo cuando existe una diferencia entre halos mayor a 5 mm), y también colocando los discos junto con Ácido Borónico (AB) siguiendo las pautas establecidas por Famiglietti y col., 2005. **(figura 9).**

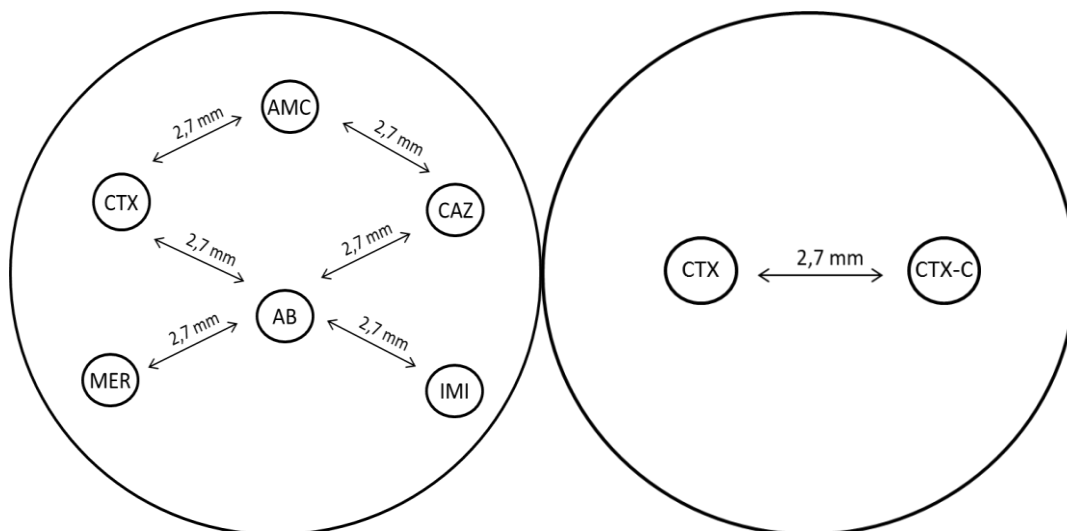


Figura 9. Disposición de discos para evaluar betalactamasas.

Referencias: AMC: Amoxicilina-clavulánico; CTX: Cefotaxime; CAZ: Ceftazidima; AB: Ácido Borónico; MER: Meropenem; IMI: Imipenem; CTX-C: Cefotaxima - Clavulánico.

4.9. Serotipificación de cepas aisladas

Las cepas fueron tipificadas con antisueros específicos en el Laboratorio del Departamento de Salud Pública de la Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Para determinar el serotipo, se utilizaron 187 sueros obtenidos en conejo (SERUNAM) contra los antígenos somáticos (O) y 53 contra los flagelares (H) del esquema antigénico de *E. coli* según la metodología reportada previamente (Qrskov y Orskov, 1984).

4.10. Análisis de los datos

Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente mediante test de diferencia de proporciones (InfoStat 2016e).

4.11. MATERIALES Y MÉTODOS ADICIONALES

Para intentar identificar el subtipo de toxina Shiga en aquellas cepas STEC-LEE negativas que resultaron no tipificables, se realizaron nuevas reacciones.

4.11.1. PCR con Hotstart taq

Se realizaron las PCR para identificación de *stx1a*, *stx1c*, *stx1d*, *stx2a*, *stx2b*, y *stx2c*, siguiendo el protocolo propuesto por Scheutz y col. (2012), utilizando Hotstart taq mix. Los cebadores utilizados figuran en la **tabla 11**, mientras que los tiempos y reactivos utilizados figuran en el anexo (**tablas 22 a 25**).

4.11.2 PCR-RFLP del gen que codifica la subunidad B de la toxina Shiga

En las cepas Stx2_{NT} se realizó el esquema de PCR seguida de digestión enzimática propuesto por Tyler y col. (1991). Los cebadores utilizados se muestran en la **tabla 26**. Las cepas EDL933, 377.3 y 248 provenientes de la colección de cepas de la cátedra de Microbiología (FCV, UBA) fueron usadas como controles positivos de *stx2*, *stx2ha* y *stx2hb* respectivamente. Las condiciones de ciclado, enzimas de restricción y tabla de interpretación se detallan en el anexo (**tablas 27 y 28**).

Tabla 26. Cebadores de amplificación propuestos por Tyler

Cebador	Secuencia	Amplicón
<i>stx2c</i>	AAGAGATGTTTATGGCGGT	285bp
<i>stx2d</i>	CACGAATCAGGTTATGCCTC	

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. Obtención y procesamiento de las muestras

Se recolectaron 196 muestras, de las cuales dos provenientes de Río Grande debieron ser descartadas por su acondicionamiento. Se procesaron 194 muestras: 124 de Río Grande (RG) (104 de feedlot y 20 de cría extensiva) y 70 de Ushuaia (U) (cría extensiva) (**tabla 29**). Las muestras provenían de cuatro establecimientos diferentes (tres de cría extensiva, uno de cría en feedlot). El número de muestras obtenidas en Ushuaia, menor a lo esperado, se debió al cierre del frigorífico por razones edilicias. El muestreo programado en ese departamento no pudo completarse en el transcurso del trabajo.

Tabla 29. Muestras procesadas por departamento y tipo de producción

	Río Grande	Ushuaia	
Campo	20	70	90
Feedlot	104	0	104
	124	70	194

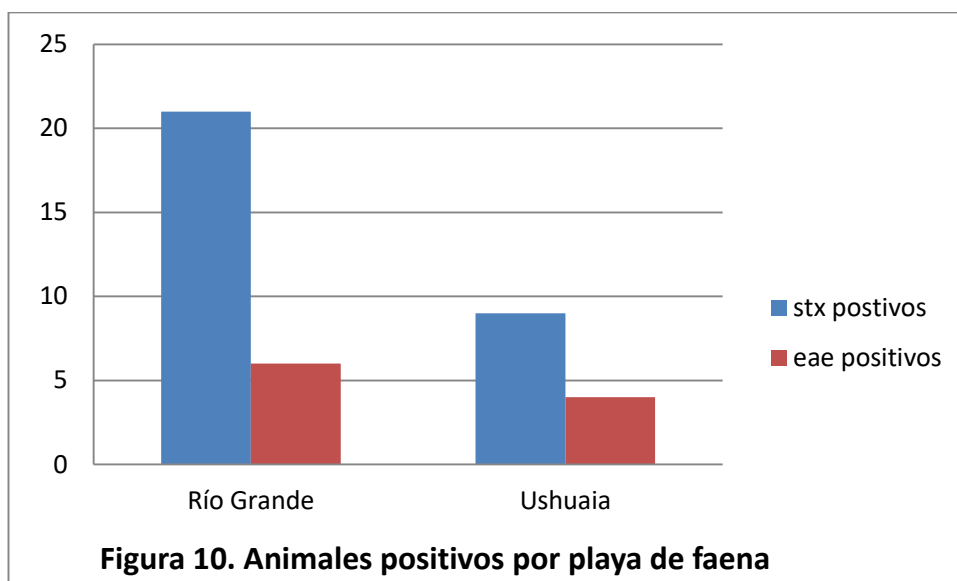
5.2 Prevalencia STEC y EPEC

La prevalencia de STEC en bovinos de TDF fue del 15% (30/194), y de EPEC de 5% (10/194). Los resultados obtenidos por tipo de producción y departamento figuran en la **tabla 30**.

Tabla 30. Proporción STEC-EPEC según tipo de producción y departamento.

	Feedlot Río Grande	Campo Río Grande	Campo Ushuaia	Prevalencia
STEC	18/104	3/20	9/70	30/194
EPEC	5/104	1/20	4/70	10/194
Razón	18/5	3/1	9/4	30/10

La cantidad de animales positivos diferenciados por playa de faena (U y RG) se detallan en la **figura 10**.



A partir de las muestras de los animales *stx* positivos se recuperaron 27 aislamientos de STEC-LEE negativos y a partir de las muestras *eae* positivas se aisló una cepa EPEC. Mediante los algoritmos realizados no se detectaron cepas AE-STECS, incluyendo STEC O157.

5.3. Caracterización de las cepas

Todos los aislamientos fueron identificados mediante bacteriología clásica como miembros de la Familia *Enterobacteriaceae*, género *Escherichia*, especie *E. coli*. Los resultados de la caracterización fenotípica y las pruebas bioquímicas realizadas figuran en la **tabla 31** y los fundamentos de las pruebas figuran en el anexo (**tabla 32**).

- **Tabla 31.** Resultados caracterización fenotípica y pruebas bioquímicas realizadas en las cepas STEC y EPEC aisladas

ID#	Morfología y afinidad tintorial	oxidasa	catalasa	OF	indol	RM	VP	citrato	SH2	Lactosa	Movilidad	Fermentación HdeC
44 cRG	Bacilo gram -	-	+	A/G	+	+	-	-	-	+	+	+
51 cRG	Bacilo gram -	-	+	A/G	+	+	-	-	-	+	-	+
56 cRG	Bacilo gram -	-	+	A/G	+	+	-	-	-	+	+	+
U13	Bacilo gram -	-	+	A/G	+	+	-	-	-	+	+	+
U17	Bacilo gram -	-	+	A/G	+	+	-	-	-	+	+	+
U27	Bacilo gram -	-	+	A/G	+	+	-	-	-	+	+	+
U41I	Bacilo gram -	-	+	A/G	+	+	-	-	-	+	+	+
U41V	Bacilo gram -	-	+	A/G	+	+	-	-	-	+	+	+
5 fRG	Bacilo gram -	-	+	A/G	+	+	-	-	-	+	+	+
8 fRG	Bacilo gram -	-	+	A/G	+	+	-	-	-	+	+	+
11 fRG	Bacilo gram -	-	+	A/G	+	+	-	-	-	+	+	+
16 fRG	Bacilo gram -	-	+	A/G	+	+	-	-	-	+	+	+
24 fRGII	Bacilo gram -	-	+	A/G	+	+	-	-	-	+	+	+
24 fRGIII	Bacilo gram -	-	+	A/G	+	+	-	-	-	+	+	+
63 fRG	Bacilo gram -	-	+	A/G	+	+	-	-	-	+	+	+
64 fRG	Bacilo gram -	-	+	A/G	+	+	-	-	-	+	+	+
66 fRGI	Bacilo gram -	-	+	A/G	+	+	-	-	-	+	+	+
66 fRGIII	Bacilo gram -	-	+	A/G	+	+	-	-	-	+	+	+
74 fRG	Bacilo gram -	-	+	A/G	+	+	-	-	-	+	+	+
85 fRG1Xa	Bacilo gram -	-	+	A/G	+	+	-	-	-	+	+	+
85 fRG1Vd	Bacilo gram -	-	+	A/G	+	+	-	-	-	+	+	+
93 fRG	Bacilo gram -	-	+	A/G	+	+	-	-	-	+	+	+
100 fRG	Bacilo gram -	-	+	A/G	+	+	-	-	-	+	+	+
114 fRGIII	Bacilo gram -	-	+	A/G	+	+	-	-	-	+	+	+
114 fRGIV	Bacilo gram -	-	+	A/G	+	+	-	-	-	+	+	+
120 fRG	Bacilo gram -	-	+	A/G	+	+	-	-	-	+	-	+

123 fRGII	Bacilo gram -	-	+	A/G	+	+	-	-	-	+	+	+
123 fRGIII	Bacilo gram -	-	+	A/G	+	+	-	-	-	+	+	+

5.4. Perfil genético y serotipos de las cepas aisladas

En la **tabla 33** se observa el perfil de virulencia genotípico de los serotipos aislados de los bovinos de TDF. De los aislamientos *stx+* obtenidos el 92,6 % (25/27) presentó *stx2* sólo (16/25) o junto con *stx1* (9/25) y 7,4% (2/27) presentó *stx1*. Al realizar la subtipificación de toxina Shiga de dichos aislamientos se observó que predominó el perfil *stx2c* (10/27) seguido por el perfil *stx1_{NT}/stx2_{NT}* (5/27). El 52% de las cepas presentó por lo menos algún subtipo de toxina no tipificable (14/27).

Entre las cepas STEC el serogrupo más frecuente fue el O185 (13/27). La cepa EPEC aislada O152:H25 resultó negativa a *bfpA*, por lo que se clasificó como aEPEC.

Tabla 33. Perfil de virulencia de las cepas aisladas

Serotipo	Número de aislamientos	Stx	eae	ehxA	bfpA ¹	ID#	Origen
O1:H21	1	stx2c	-	-		123fRG _{II}	Feedlot RG
O6:H34	1	stx1 _{NT} stx2c	-	-		123fRG _{III}	Feedlot RG
O113:H21	1	stx2c	-	+		U17	Campo U
O130:H11	1	stx1 _{NT} stx2a	-	+		44cRG	Campo RG
O130:H-	1	stx1 _{NT} stx2 _{NT}	-	+		51cRG	Campo RG
O152:H25	1	-	+	+	-	93fRG	Feedlot RG
O171:H2	1	stx2 _{NT}	-	-		U41 _v	Campo U
O174:H28	1	stx2a	-	+		56cRG	Campo RG
O178:H19	4	stx2c	-	-		5fRG, 11fRG, 16fRG, 100fRG	Feedlot RG
O178:H19	1	stx1 _{NT} stx2 _{NT}	-	+		24fRG _{II}	Feedlot RG
O179:H8	1	stx2a	-	+		74fRG	Feedlot RG
O185:H7	1	stx2c	-	+		U27	Campo U
O185:H7	1	stx2c	-	+		66fRG _I	Feedlot RG
O185:H7	1	stx2c	-	-		U13	Campo U
O185:H7	1	stx2c	-	-		8fRG	Feedlot RG
O185:H7	2	stx2 _{NT}	-	-		63fRG, 64fRG	Feedlot RG
O185:H19	1	stx1a	-	+		85fRG _{1Vd}	Feedlot RG
O185:H19	1	stx1 _{NT}	-	+		66fRG _{III}	Feedlot RG
O185:H19	2	stx1a stx2 _{NT}	-	+		114fRG _{IV} , 85fRG _{1Xa}	Feedlot RG
O185:H19	3	stx1 _{NT} stx2 _{NT}	-	+		114fRG _{III} , 120fRG 24fRG _{III}	Feedlot RG
O187:H7	1	stx2 _{NT}	-	-		U41 _I	Campo U

Referencias: 1-En cepas eae+, se evaluó la presencia de bfpA; NT: No tipificable

5.5. Producción toxina Shiga

Todas las cepas STEC aisladas resultaron positivas a la producción de toxina Shiga (figura 11), con excepción de las cepas #U41_I (O187:H7) y #123fRG_{II} (O1:H21).



Figura 11. Evaluación de producción de toxina Shiga.

5.6. Ensayos de adhesión en cultivo celular

Debido al bajo poder de adhesión observado a las células HeLa, su patrón no pudo ser definido (figura 12). Mediante tinción de FAS se comprobó que la cepa aislada tenía la capacidad de generar la lesión de citoesqueleto típica de EPEC (figura 13).

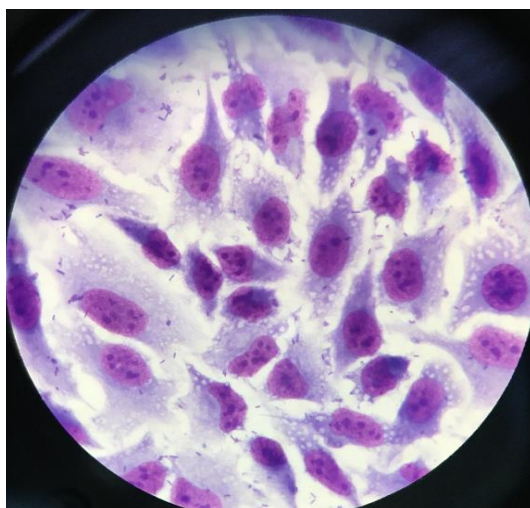


Figura 12. Adhesión celular en línea HeLa

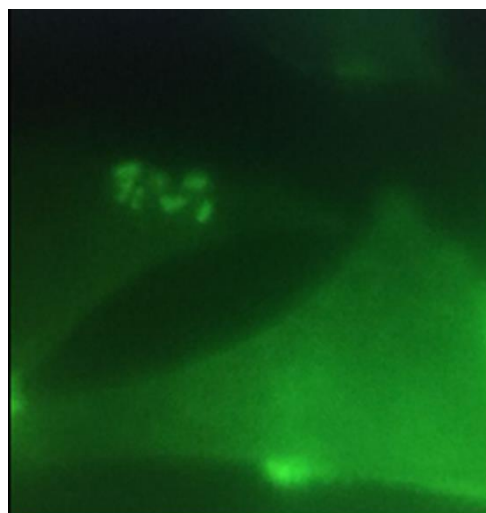


Figura 13. Determinación de lesión A/E mediante tinción FAS

5.7. Identificación de patovares híbridos

Se analizaron todos los aislamientos STEC y de EPEC en busca de factores de

virulencia marcadores de otros patovares. No se detectaron cepas híbridas en este trabajo.

5.8. Producción de enterohemolisina calcio dependiente

Doce de las dieciséis cepas portadoras del gen *ehxA* fueron capaces de producir la hemólisis esperada (**figura 14**). Las 4 cepas que no expresaron la enterohemolisina calcio dependiente en AGRL fueron #U17 (*stx2c*), #U27 (*stx2c*), #66fRG_I (*stx2c*) y #93fRG (EPEC).

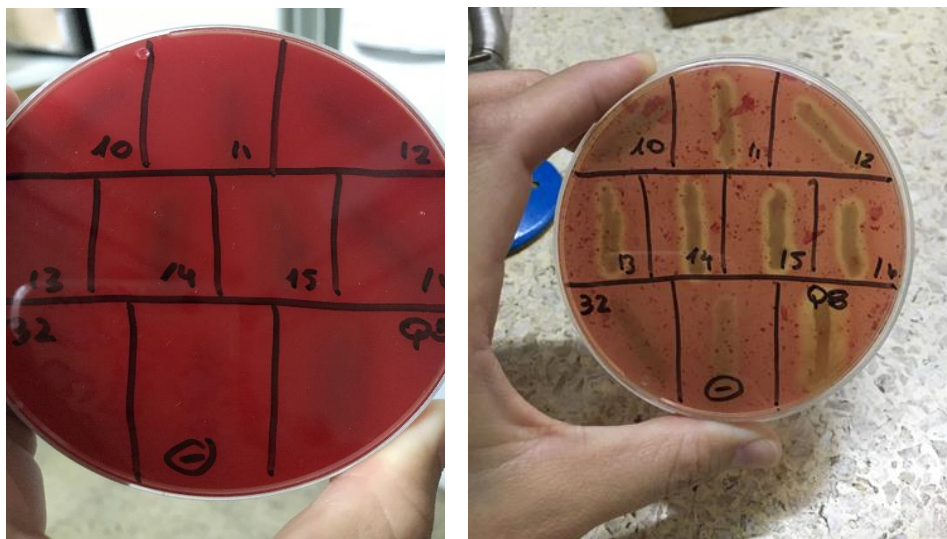


Figura 14. Cepas aisladas sembradas en AGRSL y AGRL.

Referencias: Se puede observar en la placa AGRL el halo de hemólisis alrededor de la línea de siembra de las cepas identificadas provisoriamente como 11, 12, 13, 14, 15 y 16, y en el control positivo cepa FF6 (Q8). Control negativo SS19.

5.9. Suceptibilidad a antimicrobianos

La interpretación de los resultados obtenidos en los ensayos de susceptibilidad puede observarse en la **tabla 34**. Todas las cepas analizadas resultaron resistentes a Ampicilina. Los análisis posteriores no permitieron confirmar que ésta resistencia esté dada por la presencia de betalactamasas. Si bien algunas cepas mostraron resistencia a más de un antibiótico, ninguna resultó ser multiresistente. Los valores de los halos en los distintos ensayos se detallan en el anexo (**tablas 35 y 36**)

Tabla 34. Interpretación de los resultados de susceptibilidad a antimicrobianos

ID	AMP	AK	NA	CIP	C	CN	NOR	S	TE	STX	COL*
5fRG	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
8fRG	R	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S
11fRG	R	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S
16fRG	R	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S
24fRG II	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
24fRG III	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
63fRG	R	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S
64fRG	R	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S
66fRG I	R	I	S	S	S	S	S	I	S	S	S
66fRG III	R	I	S	S	S	S	S	R	S	S	S
74fRG	R	I	S	S	S	S	S	I	S	S	S
85fRG 1Xa	R	I	S	S	S	S	S	R	S	S	S
85fRG 1Vd	R	R	S	S	S	S	S	I	S	S	S
100fRG	R	R	S	S	S	S	S	I	S	S	S
114fRG III	R	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S
114fRG IV	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
120fRG	R	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S
123fRG II	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
123fRG III	R	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S
93fRG	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
44cRG	R	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S
51cRG	R	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S
56cRG	R	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S
U13	R	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S
U17	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
U27	R	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S
U41 I	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
U41 V	R	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S

Referencias: AMP: ampicilina, AK: amikacina, NA: ác. Nalidixico, CIP: ciprofloxacina, C: cloranfenicol, CN: gentamicina, NOR: norfloxacina, S: estreptomina, TE: tetraciclina, STX: trimetroprima-sulfametoxazol, COL: colistina.

*Colistina se analizó con el método de COLISTIN AGAR-SPOT.

5.10 Análisis de los datos

No se encontraron diferencias estadísticas significativas entre las variables analizadas (tipo de producción, establecimiento de origen del animal y ubicación del matadero) y el aislamiento de los patógenos (STEC o EPEC) ($p > 0,05$).

5.11 RESULTADOS ADICIONALES

Al realizar el análisis complementario de las cepas primeramente identificadas como no tipificables se pudo identificar el subtipo en 7 de los 8 aislamientos *stx1_{NT}*, todos provenientes de Río Grande. Se identificó *stx1a* en 6 aislamientos, 2 de campo y 4 de feed lot, y *stx1c* en otro aislamiento de feedlot. Quedó aún un aislamiento *stx1_{NT}* proveniente de feedlot de Río Grande.

De las 11 cepas *stx2_{NT}* detectadas con los protocolos propuestos, 8 pudieron ser subtipificadas mediante PCR del gen que codifica la subunidad B de la toxina y análisis del polimorfismo del tamaño de los fragmentos de restricción, detectándose el subtipo *stx2* correspondiente a EDL en un aislamiento de campo de RG, y 7 *stx2hb* de aislamientos obtenidos de animales de feedlot de RG. Tres cepas continúan como *stx2_{NT}*, una de feedlot de RG y 2 de campo de Ushuaia.

Los resultados completos de la subtipificación se observan en la **tabla 37**.

Tabla 37. Perfil de virulencia de las cepas aisladas

Serotipo	Número de aislamientos	Stx	eae	ehxA	bfpA ¹	ID#	Origen
O1:H21	1	<i>stx2c</i>	-	-		123fRG _{II}	Feedlot RG
O6:H34	1	<i>stx1c stx2c</i>	-	-		123fRG _{III}	Feedlot RG
O113:H21	1	<i>stx2c</i>	-	+		U17	Campo U
O130:H11	1	<i>stx1a stx2a</i>	-	+		44cRG	Campo RG
O130:H-	1	<i>stx1a stx2</i>	-	+		51cRG	Campo RG
O152:H25	1	-	+	+	-	93fRG	Feedlot RG
O171:H2	1	<i>stx2_{NT}</i>	-	-		U41 _V	Campo U
O174:H28	1	<i>stx2a</i>	-	+		56cRG	Campo RG
O178:H19	4	<i>stx2c</i>	-	-		5fRG, 11fRG, 16fRG,100fRG	Feedlot RG
O178:H19	1	<i>stx1a stx2_{NT}</i>	-	+		24fRG _{II}	Feedlot RG
O179:H8	1	<i>stx2a</i>	-	+		74fRG	Feedlot RG
O185:H7	1	<i>stx2c</i>	-	+		U27	Campo U
O185:H7	1	<i>stx2c</i>	-	+		66fGR _I	Feedlot RG
O185:H7	1	<i>stx2c</i>	-	-		U13	Campo U
O185:H7	1	<i>stx2c</i>	-	-		8fRG	Feedlot RG
O185:H7	2	<i>stx2hb</i>	-	-		63fRG,64fRG	Feedlot RG
O185:H19	1	<i>stx1a</i>	-	+		85fRG _{1Vd}	Feedlot RG
O185:H19	1	<i>stx1a</i>	-	+		66fRG _{III}	Feedlot RG
O185:H19	4	<i>stx1a stx2hb</i>	-	+		114fRG _{III} ,114fRG _{IV} , 85fRG _{1Xa} , 120fRG	Feedlot RG
O185:H19	1	<i>stx1_{NT} stx2hb</i>	-	+		24fRG _{III}	Feedlot RG
O187:H7	1	<i>stx2_{NT}</i>	-	-		U41 _I	Campo U

Referencias: 1-En cepas *eae+*, se evaluó la presencia de *bfpA*; NT: No tipificable

De los aislamientos *stx+* obtenidos el 92,6 % (25/27) presentó *stx2* sólo o junto con *stx1*. Al realizar la subtipificación de toxina Shiga de dichos aislamientos se observó que predominó el perfil *stx2c* (10/27) seguido por el perfil *stx1a/stx2hb* (4/27). El 14,8% de las cepas presentó por lo menos algún subtipo de toxina no tipificable (4/27).

DISCUSIÓN

5 DISCUSIÓN

Diversos estudios reconocen a los rumiantes como el principal reservorio de STEC, destacándose el rol de los bovinos (Beutin y col., 1993; Parma y col., 2000; Tanaro, y col., 2014). En el presente trabajo se analizó la prevalencia de STEC (STEC-LEE negativo y AE-STEC) y EPEC en bovinos de TDF. Se analizaron 194 muestras de materia fecal de bovinos tomadas por hisopado rectal en playa de faena. El tamaño de la muestra difiere del planteado inicialmente, debido a que dos de las muestras de Río Grande debieron ser descartadas por su acondicionamiento, y a su vez el frigorífico de Ushuaia cerró por tiempo indeterminado por problemas edilicios. Esta situación limitó la posibilidad de alcanzar las muestras necesarias provenientes de dicha playa de faena.

De las 194 muestras, 124 provenían de Río Grande (RG) (104 de un feedlot y 20 de cría extensiva de 2 establecimientos) y 70 de Ushuaia (U) (todos animales de cría extensiva del mismo establecimiento). Por lo expuesto, las muestras provenían de cuatro establecimientos diferentes (tres de cría extensiva, uno de cría en feedlot).

Al comparar los datos obtenidos según el tipo de producción, establecimiento de origen del animal y ubicación del matadero, no encontramos diferencias estadísticas significativas para la detección de los patógenos STEC y EPEC. Masana y col. (2010) tampoco encontraron diferencias en el nivel de detección de STEC O157 al analizar las muestras según tipo de producción (campo vs feedlot). No obstante, en otros trabajos se informa que el porcentaje de detección de cepas AE-STEC y serogrupo O157 en muestras provenientes de feedlot (Padola y col., 2004; Tanaro y col., 2012) es superior a los datos obtenidos en trabajos a campo, tanto en ganado de carne como en ganado lechero (Fernández y col., 2010; López y col., 2012). En explotaciones intensivas de engorde a corral, la prevalencia de STEC en el ganado alcanza 62,7% (Padola y col., 2004). Se identifica al sistema de feedlot como uno de los sistemas productivos más contaminantes (Tanaro y col. 2010; 2014). Cabe destacar que las condiciones de los estudios no están estandarizadas, y que el tipo de muestreo puede influir en estos resultados.

A partir del análisis de las muestras, se encontró que la prevalencia de STEC en bovinos de TDF fue del 15%, siendo todas las cepas aisladas STEC-LEE negativo. Este resultado es menor y difiere de la situación estimada para el resto del país. Diversos estudios indican que la prevalencia para STEC en Argentina varía entre el 22% y el 67% (Parma y col., 2000; Padola y col., 2004; Pizarro y col., 2014; Etcheverría y col., 2016). Si tenemos en cuenta las diferencias en la detección de STEC según la época del año, tipo de producción, alimentación, raza y edad del ganado, la variabilidad de resultados en el país es considerable (Parma y col., 2000; Padola y col., 2004; Masana y col., 2010; Rivero y col., 2012; Fernández y col., 2013; Rhades y col.,

2019). Mediante muestreos repetidos se describen aislamientos diferentes para los mismos animales a lo largo del tiempo, con variaciones en el serotipo STEC (Padola y col., 2004) o en el perfil de virulencia AE-STECS (Rhades y col., 2019) en más de un muestreo. No se descarta la posibilidad de contagio entre animales o la coexistencia de diversas cepas en el portador.

En lo que a EPEC respecta, el porcentaje de detección fue bajo, alcanzando una prevalencia en bovinos de TDF del 5%, similar a la obtenida por Pizarro y col. (2014) en Mendoza, quienes informaron una prevalencia para EPEC cercana al 6%. Hasta nuestro conocimiento no se han realizado otros estudios de portación de EPEC en bovinos en Argentina, limitando las comparaciones dentro del país. Las prevalencias en otros países son variadas. En España, Orden y col. (2002) analizaron muestras de materia fecal de ganado bovino detectando una prevalencia de EPEC del 8,2%. En Estados Unidos, Singh y col. (2015) compararon la portación de cepas de *E. coli* en bovinos y ciervos en un ecosistema compartido, estableciendo una prevalencia de aEPEC en el ganado lechero del 32%. Por otro lado en San Pablo, Brasil, Ribeiro y col. (2019) establecen una prevalencia de EPEC de 6,25% sobre 160 muestras de materia fecal de bovinos.

El perfil de virulencia de las 27 cepas STEC aisladas en este trabajo es variado. Se observó predominio del gen que codifica para Stx2, presente en el 92% de las cepas. De los 19 aislamientos obtenidos de bovinos que provenían de feedlot, 17 portaban *stx2* (7/17 en combinación con *stx1*). Por su parte, los 8 aislamientos totales provenientes de campo portaban el gen *stx2* (2/8 en combinación con *stx1*).

En forma similar a las descripciones de otros grupos de trabajo del país considerando animales en edad de faena, se detectó *stx1* en menor número de muestras y predominio de cepas *stx2+*, (Parma y col., 2000; Masana y col., 2011; López y col., 2012; Pizarro y col., 2014; Brusa y col., 2017). En nuestro estudio pudimos detectar y aislar once cepas que portaban el gen *stx1*. En 8 de estas cepas no se logró identificar el subtipo por PCR en una primera etapa, pese a que los controles de cada reacción eran correctos y validaban los protocolos, por lo que se realizaron nuevas determinaciones. Utilizando los protocolos de Scheutz y col. (2012) con Hotstart taq mix, 7/8 cepas consideradas NT fueron identificadas, correspondiendo a *stx1a* (6) y *stx1c* (1). Una de las cepas (24fRG_{III}) permanece como *stx1*_{NT}.

Si bien podría considerarse que estos resultados a partir de la nueva enzima son los correctos, los ensayos previos donde se observó la ausencia de amplicón para estas muestras junto a la presencia de los mismos, en las calles de los controles positivos, podrían ser concordantes con variantes en el gen estudiado. Recientemente el panel EFSA BIOHAZ (2020) indica la caracterización de un nuevo subtipo la *stx1e*, aunque el mismo ha sido encontrado en *Enterobacter cloacae* y no en *E. coli* (EFSA BIOHAZ y col., 2020).

El subtipo prevalente identificado fue *stx2c* (37%). En el primer análisis el perfil *stx2_{NT}* tuvo una prevalencia igual a la del *stx2c*, totalizando su presencia en 11/27 aislamientos. Considerando los animales criados a campo observamos que de los 8 aislamientos en 3 se detectó el subtipo *stx2c*, en 2 el *stx2a* y en 3 de ellos no pudo determinarse el subtipo mediante el esquema de subtipificación propuesto inicialmente. Sin embargo nuestros estudios complementarios de estas tres cepas *stx2_{NT}* nos permitieron definir que una de ellas era compatible con *stx2a* en base al análisis de PCR-RFLP (Tyler y col., 1991). Finalmente, en los resultados de los aislamientos de cria a campo, se detectó en 3 el subtipo *stx2c*, en 3 el *stx2a* y en 2 de ellos (origen: Ushuaia) no pudo determinarse el subtipo. Particularmente, la cepa U41, (O187:H7, *stx2_{NT}*, sin detección por ELISA de toxina Shiga) permanece aún luego de estas nuevas determinaciones como NT.

En los aislamientos obtenidos de feedlot 8/25 se definieron como *stx2_{NT}*. Al analizar el perfil obtenido de PCR-RFLP (Tyler y col., 1991), 7/8 aislamientos se identificaron como *stx2hb*, pero continúan NT mediante el esquema de Scheutz, incluso utilizando la enzima Hotstart. En el caso de Stx2 que cuenta con mayor cantidad de subtipos también surge la incógnita de la posible variación en la secuencia genética blanco del subtipo. Nuevos subtipos de Stx2 han sido descritos por Werber y Scheutz (2019), quienes señalan una casuística baja hasta el momento.

El panel EFSA BIOHAZ describe también nuevos subtipos para *stx2*. En la actualidad, no existe un protocolo validado para la detección y subtipificación de estos nuevos subtipos *stx1e* y *stx2h-stx2l*. Por lo tanto, su relevancia clínica y epidemiológica, así como la prevalencia, aun deben ser estudiadas (EFSA BIOHAZ y col., 2020). Nuestros resultados permiten considerar que las cepas STEC que colonizan el ganado nativo podrían ser diferentes a las que circulan en la región continental de Argentina, podrían tener características semejantes a las variantes descritas o bien características propias.

Considerando estos resultados, sumado a que aún con técnicas adicionales quedan cuatro aislamientos NT (una cepa *stx1_{NT}* y tres *stx2_{NT}*) los resultados finales de identificación de las cepas aisladas de TDF deberán realizarse mediante su secuenciación. La nomenclatura de los subtipos *stx* se refina continuamente. El uso creciente de la secuencia del genoma completo debería ayudar a aclarar las asociaciones de los subtipos de *stx* con enfermedades graves. (EFSA BIOHAZ y col., 2020). La secuencia del genoma completo también ha indicado la asociación de diferentes subtipos *stx* con diferentes perfiles de virulencia.

Con los estudios adicionales aún se distingue *stx2c* como el perfil predominante (10/27), seguido por el perfil *stx1a/stx2hb* (4/27). El 14% de las cepas presentó por lo menos algún subtipo de toxina no tipificable (4/27). Otros trabajos también tuvieron como resultados de sus

análisis cepas no tipificables, pero en menor proporción (Masana y col., 2011; Tanaro y col., 2012; Brusa y col., 2017; Cundon y col., 2018; Rhades y col., 2019).

Masana y col. (2010) analizaron muestras de materia fecal de bovinos en frigoríficos exportadores en busca de cepas O157 y en otro estudio lo hicieron considerando no-O157 (Masana y col. 2011). El subtipo predominante detectado en las cepas O157 aisladas fue *stx2/stx2c* (vh-a) (56%) mientras que en las cepas no-O157 el subtipo prevalente fue *stx2* (28,3%). La subtipificación en estos trabajos se realizó utilizando los protocolos de Tyler, y detalla dentro del grupo no-O157 la presentación de cepas *stx2_{NT}* (1,6%).

Rhades y col. (2019), también detectaron predominio de cepas *stx2c* analizando la variedad de excreción en cepas O157. Al igual que en nuestro estudio hubo cepas que resultaron no tipificables (23%) utilizando el protocolo de Scheutz y col. (2012); sin embargo no consideraron realizar un análisis de las mismas mediante PCR-RFLP. Se ha reportado que las cepas que producen *stx2a*, *stx2c* y *stx2d* son más patógenas que aquellas cepas que producen solo *stx1* o la combinación de ambas toxinas (Rivas y col., 2016).

Al evaluar la capacidad de producir toxina, se detectó que 25/27 cepas produjeron la toxina Shiga. Las dos cepas STEC aisladas en las que no se detectó producción de toxina Shiga a partir del test de ELISA de membrana, #123fRG_{II} y #U41_I, correspondieron a los subtipos *stx2c* y *stx2_{NT}* respectivamente. Miliwebsky y col. (2018) detectaron que la sensibilidad del test puede variar según el subtipo de Stx, sumado a características de la cepa y a la cantidad de toxina producida. Si bien las modificaciones realizadas en la técnica fueron analizadas previamente en el laboratorio, y se utilizaron los controles positivos de las cepas patrones, ante la presencia de cepas con subtipos NT o posibles variantes respecto a los subtipos frecuentes, la producción de toxina Shiga o su ausencia debería volver a cotejarse utilizando los medios de cultivo recomendados por el proveedor y para llegar a resultados concluyentes, se deberían realizar pruebas de toxicidad en células Vero.

Al analizar la combinación de marcadores moleculares, que nos permite categorizar las cepas en AE-STECS o STEC-LEE negativas, no se detectaron en este estudio cepas AE-STECS, al igual que lo reportado en Mendoza por Pizarro y col. (2014), quienes analizaron muestras de materia fecal de ganado bovino en playa de faena. Cabe destacar que existen casos de SUH asociados a cepas STEC-LEE negativas, lo que demuestra que el rol de la intimina no es esencial para el desarrollo de la enfermedad ya que estas cepas utilizarían otros mecanismos de adhesión (Fernández y col., 2010). En nuestro trabajo, ninguna cepa analizada portaba el gen *saa*, factor que ha sido postulado como responsable de la adhesión en cepas STEC-LEE negativas ante la ausencia de intimina. Queda pendiente evaluar otras posibles formas de adhesión de estas cepas para confirmar su patogenicidad, como la presencia del Locus de

Adhesión y Autoagregación (LAA) descrito por Montero y col. (2017, 2019) en cepas STEC-LEE negativas.

Otros estudios realizados también detectaron cepas AE-STECS en baja proporción. Orden y col. (2002) describen que el perfil genético prevalente de las cepas aisladas a partir de ganado sano en España es *stx2+ eae-* (cepas STEC-LEE negativas). Este análisis coincide con estudios previos (Beutin y col., 1995; Blanco y col., 1996; Parma y col., 2000; Pizarro y col., 2014). Parma y col. (2000) detectaron como prevalente el perfil genético *stx2+ eae-* en cepas provenientes de ganado adulto de la región pampeana, siendo las cepas AE-STECS poco frecuentes (2,5%). Fernández y col. (2010) aislaron 170 cepas STEC a partir de 1440 muestras de materia fecal de ganado lechero, detectando un total de 5/170 cepas AE-STECS (3%), pertenecientes a los grupos O157 (n:3), O5 (n:1) y O74 (n:1). Resultados similares obtuvieron Etcheverría y Padola (2013), quienes al analizar aislamientos de STEC obtenidos a partir de bovinos, carne picada y ambiente, encontraron el perfil genético *stx2/eae/ehxA*, pero en menor proporción que *stx2*, *stx2/ehxA/saa*, *stx1/stx2/ehxA/saa*.

Una situación diferente, con mayor porcentaje de detección de cepas AE-STECS se describe en otros reportes en Argentina (Masana y col., 2010, 2011; Tanaro y col., 2012; López y col., 2012). Masana y col. (2010) analizaron muestras de materia fecal de bovinos en frigoríficos exportadores en busca de cepas O157, mientras que en otro estudio lo hicieron considerando no-O157 (Masana y col. 2011). La prevalencia de cepas STEC no-O157 fue del 22.3%, y de las cepas aisladas, el 11% fue AE-STECS (Masana y col., 2011). Tanaro y col. (2012) analizaron muestras por hisopado rectal provenientes de un establecimiento de ganado bovino de carne, detectando el perfil genotípico *stx1/eae/ehxA* en un 16.8%. López y col. (2012), analizaron muestras de materia fecal de bovino de feedlot en Argentina, obteniendo 97 aislamientos donde se detectó en el 21% de las cepas el perfil genético *stx2/eae (ehxA-)*, si bien no fue el prevalente.

Existen estudios realizados en el país que informan la presencia de cepas AE-STECS en relación al serogrupo O157 (Fernández y col., 2009; Masana y col., 2010; Rivero y col., 2012; Rhades y col., 2019). Es importante mencionar que el foco de atención de muchos trabajos previos estaba dirigido a la detección de cepas O157:H7. Si bien ello es consecuencia de los grandes brotes causados por este serotipo desde su inicio (Riley y col., 1983), y del estudio del impacto de los seropatótipos definido por Karmali y col. (2003), los métodos de diagnóstico utilizados por un largo período de tiempo se desarrollaron específicamente para la detección del serogrupo O157. Existen entonces pocos grupos de trabajo dedicados al estudio del patovar STEC en forma genérica. Posteriormente se detectaron serogrupos no-O157 AE-STECS, asociados a enfermedad en humano (como los incluidos dentro del panel *Big-six*), por lo que nuevamente surgen una serie de protocolos (en coincidencia con los parámetros de legislación

en el control de alimentos Resolución Conjunta 4-E/2017, Ministerio de Salud) que realizan el rastillaje de dichos serogrupos, sin considerar el riesgo potencial de cepas STEC que circulan en diversas regiones particulares y STEC LEE-negativas. En Argentina es obligatoria la búsqueda en productos alimenticios de los serogrupos O157 y los no-O157 (O26, O103, O111, O145 y O121), que se incluyen en la categoría AE-STEC.

A diferencia de otros estudios, en el presente trabajo la prevalencia del serogrupo O157 fue del 0%. Masana y col., (2010), por su parte, determinaron una prevalencia promedio para AE-STEC O157 del 4.1%, con variaciones desde 2,7% a 5,7% según la estación, evidenciando valores máximos en primavera. Todas las cepas O157 aisladas presentaron los genes *stx2/eae/ehxA*. Etcheverría y Padola (2013) encontraron en el análisis de cepas que el 3% pertenecían al serotipo O157:H7. Rhades y col. (2019), analizaron la variedad de excreción en cepas O157. Todas las cepas aisladas portaron el gen *eae*. La mayoría de las cepas eran capaces de producir ambos tipos de Stx (56%). Rhades y col., (2019), encontraron prevalencias de *E. coli* O157 desde 0,85% hasta 11% según etapa de producción y época del año, registrándose el pico máximo durante la cría al finalizar el verano. Podríamos considerar que los animales que entraron a faena en TDF a diferencia del estudio de Rhades y col. (2019) son animales de mayor edad, y que los muestreos no coincidieron con la temporada estival. Por su parte, Padola y col. (2004) analizaron muestras por hisopado rectal de ganado bovino de feedlot. De las cepas aisladas en ese trabajo, el 38,6% de las cepas fueron AE-STEC, incluyendo O103:H2, O145:H-, O146:H21, O157:H7 y una cepa ONT:H-. En el trabajo de Rivero y col. (2004) se recolecta información de las cepas aisladas de bovinos en feedlot y a campo donde se incluyen los serogrupos O5, O26, O38, O103, O118, O145, O146, O165 y O157 en el grupo AE-STEC, mientras que los serogrupos O2, O15, O20, O25, O39, O74, O79, O88, O91, O113, O116, O117, O120, O141, O168, O171, O174, O175 y cepas ONT corresponden a STEC-LEE negativos.

Las cepas STEC-LEE negativas aisladas en este trabajo pertenecieron a serogrupos no-O157. Algunos de los serotipos identificados en este trabajo (O1:H21; O6:H34; O113:H21; O130:H11; O130:H-; O171:H2; O174:H28; O178:H19; O179:H8; O185:H7; O185:H19; O187:H7) han sido detectados previamente en estudios realizados en el país. En el análisis de muestras de carcasas y cortes en frigoríficos en Argentina, Brusa y col. (2017) aislaron cepas que pertenecieron a los serogrupos O174, O178, O179, O185, y encontraron como serotipos más prevalentes a O174:H21, O185:H7, O178:H19 y O130:H11, representando el 42,5% de los aislamientos.

Por su parte, Rivas (2013) menciona que los serogrupos no-O157 asociados a casos clínicos prevalentes en Argentina son O145, O121, O26 y O174. Las cepas prevalentes STEC no-O157 señaladas como responsables del 30% de SUH post-entérico en Argentina en el

período 2004-2009 incluyen los serogrupos O145, O121, O26, O174, O111 y O103 (Masana y col., 2011). Se destaca O174 como una cepa STEC-LEE negativa, mientras que O145, O121, O26, O111 y O103 corresponden a la categoría AE-STEC. Cundon y col. (2018) analizaron cepas O174:H21 y O174:H28 provenientes de diversas fuentes (ganado bovino, alimentos, humanos, de Argentina y Uruguay). El perfil de virulencia predominante entre las O174:H28 aisladas de ganado bovino (*stx2a/ehxA*) coincide con el perfil de la cepa O174:H28 aislada en el presente trabajo.

El serogrupo O174 ha sido responsable de cuadros de SUH (Masana y col., 2011) y se considera un patógeno emergente en Argentina. Este no es un dato menor, ya que describe un serogrupo STEC-LEE negativo de impacto clínico que no es identificado cuando el análisis se centra en la detección de AE-STEC tal como lo indican las normas de comercio internacional. La norma se ajusta a intereses comerciales debido a la casuística previa de países importadores de carne, aunque dejan liberada la presencia de un conjunto de cepas con riesgo potencial, ya que han sido consideradas de bajo impacto. La plasticidad del genoma de *E. coli* (Ahmed y col., 2008) permite suponer que el intercambio de genes y la adquisición de factores de virulencia en cepas STEC no queda limitada a la norma comercial. Tal como ocurrió con el patovar híbrido Stx-EAEC O104:H4 en Alemania (Scheutz y col., 2011), o la detección de híbridos Stx-EAEC O59:NM[H19] en Argentina (Carbonari y col., 2018), la emergencia de cepas altamente virulentas podría preverse con criterios de detección de STEC en forma genérica desde el punto de vista de Una Salud. En Argentina la primer cepa O104:H4 aislada se obtuvo a partir de un caso clínico en la provincia de Chubut (Carbonari y col., 2014). El análisis de las cepas obtenidas en este trabajo no permitió detectar patovares híbridos, ya que no se evidenció la presencia conjunta de factores de virulencia.

Diferentes estudios detectaron STEC O130:H11 y STEC O178:H19 como serotipos prevalentes de STEC en Argentina a partir de ganado lechero, de feedlot, frigoríficos, carne de mercados locales y (Masana y col., 2011; López y col., 2012; Fernández y col., 2013, Llorente y col., 2014). Ambos serotipos han sido asociados a casos de SUH y DAS. El serotipo STEC O178:H19 del cual aislamos 5 cepas, ha sido asociado a casos esporádicos de SUH en Alemania (Bielaszewska y col., 2006; Werber y col., 2008) y Brasil (De Toni y col., 2009). STEC O178:H19 también fue señalado como agente causal de SUH en Bélgica (Buvens y col., 2010) y Argentina (Giugno y col., 2007). Una comparación de aislamientos de STEC O178:H19 provenientes de diversas fuentes y países, incluyendo cepas de Argentina, confirman la ausencia del gen *eae* en todas las cepas sin por ello descartar su rol como patógeno (Miko y col., 2014).

Etcheverría y Padola (2013) detectaron como serotipos prevalentes a O8:H19, O26:H11, O91:H21, O113:H21, O117:H7, O130:H11, O145:H-, O157:H7, O171:H2, y

O178:H19, algunos de los cuales resultaron comunes entre las muestras de distinta fuente (alimentos, ganado y ambiente). La detección de serotipos no-O157 se ha incrementado. Los casos humanos asociados a cepas no-O157 han aumentado a nivel mundial en un 60%, mientras que los casos asociados a STEC O157 en un 13% (Coombes y col., 2008). Estos cambios también pueden obedecer a modificaciones en las rutas diagnósticas, con la aparición de estudios para detectar serogrupos que antes eran ignorados y sobre los cuales no había la misma presión de diagnóstico que para STEC O157. De hecho, es preciso destacar que dentro del incremento de las STEC no-O157 se incluye cepas AE-STECS sin diferenciarlas.

Delannoy y col. (2017) analizaron los serogrupos O1 y O2 incluyendo cepas STEC aisladas de humanos, entre ellas el serotipo O1:H21 como la obtenida por nosotros en este estudio de bovinos (#123fRG_{II}). Llama la atención también el antígeno flagelar H21, que se ha asociado a serogrupos STEC LEE-negativo de impacto clínico como O91:H21 y O174:H21. También hemos aislado una cepa O113:H21, reportada previamente en el estudio de Masana y col. (2011).

Existen pocos datos de STEC O6:H34, sin embargo Qin y col. (2015) aíslan este serotipo de casos clínicos pediátricos. A su vez, Wang y col. (2018) realizan un estudio de persistencia, durante 3 años en un rodeo de bovinos de carne en Canadá y aíslan STEC O6:H34 *stx2* en 26/259 animales, en particular el serogrupo es aislado en 2 de los 3 años del muestreo. En nuestro trabajo, este serogrupo es aislado de la muestra #123fRG_{III} proveniente de un animal de feedlot.

Respecto al serotipo O187:H7 (al que pertenece la cepa #U41_I, *stx2*_{NT} proveniente de rodeo a campo de Ushuaia) no se reportan muchos hallazgos. Sin embargo, los patotipos híbridos de *E. coli* representan amenazas emergentes para la salud pública. Nyholm y col., (2015) han informado que los híbridos de *E. coli* productora de toxina Shiga y enterotoxigénica (STEC / ETEC) están asociados con enfermedad diarreica y SUH. Bai y col., (2019) han informado la caracterización de cuatro híbridos STEC / ETEC en Suecia pertenecientes a serotipos poco comunes (O15:H16, O187:H28, O100:H30 y O136:H12). Además de ello informan que detectaron la presencia de *stx2a* y *stx2e* junto a diferentes copias del marcador de virulencia ETEC. Si bien el serotipo no corresponde al de nuestro aislamiento, es interesante la presencia de este serogrupo con un subtipo no definido entre los aislamientos de TDF.

Con respecto a aEPEC, la cepa aislada perteneció al serotipo O152:H25. Hasta el momento no hay suficientes estudios para determinar serogrupos o serotipos prevalentes de este patovar en cepas de bovino del país. En Brasil, Aidar-Ugrinovich y col. (2007) detectaron a O26:H11, O123:H11 y O177:H11 como serotipos prevalentes en muestras de materia fecal de terneros (sanos y con diarrea). Hasta nuestro conocimiento, el serotipo aislado en nuestro

trabajo no ha sido asociado a cuadros de diarreas en el humano. No obstante, el serogrupo O152 ha sido asociado a cepas enteroinvasivas, EIEC, aisladas de cuadros clínicos (Cheasty y Rowe, 1983; Beutin y col., 1997; da Silva y col., 2017).

La cepa aEPEC analizada en este trabajo no mostró un patrón de adhesión definido al realizar ensayos en cultivo celular. Esta situación difiere de la analizada por Bentancor y col. (2010) con cepas EPEC O157:H16 aisladas de animales en Argentina, donde observaron que las cepas respetaron los patrones esperados (adherencia localizada para tEPEC y adherencia localizada-like para aEPEC). Es importante resaltar que los patrones de adhesión están caracterizados a partir de cepas humanas, no pudiéndose descartar que las cepas de origen animal se comporten de modo diferente, o que su expresión esté condicionada a la línea celular. En nuestro caso, el perfil de adhesión podría verse afectado según los receptores celulares específicos de especie. De todas formas, aún sin patrón de adhesión definido, la capacidad de la cepa de generar lesión de tipo A/E no se vio afectada. Estudios previos indican que el SST3 y sus proteínas efectoras contribuyen a la capacidad de adhesión de las cepas aEPEC ante la ausencia de BFP (Santos y col., 2019).

Teniendo en cuenta factores de virulencia adicionales, en el presente trabajo el 57% de las cepas aisladas portó el gen para la producción de enterohemolisina. Doce de las dieciséis cepas portadoras del gen fueron capaces de producir la hemólisis esperada. La producción de enterohemolisina calcio dependiente (EHEC-Hly; también denominada Ehx) posee correlación con cepas de impacto clínico (Beutin y col., 1989). La detección de esta enterohemolisina fue uno de los criterios de identificación de cepas de potencial patogénico (Beutin y col., 1989; Schwidder y col., 2019). Varios estudios realizados en el país encontraron este gen dentro de los perfiles genotípicos prevalentes de las cepas analizadas (Fernández y col., 2010; Masana y col., 2010; Etcheverría y Padola, 2013). Una de las cepas portadoras del gen *ehxA* es la cepa aEPEC (93fRG). Existen diversos estudios que han detectado previamente este factor de virulencia asociado a cepas EPEC atípicas (Vieira y col., 2001; Cookson y col., 2007; Hernandez y col., 2009; Zhang y col., 2018). No obstante, podría analizarse si la cepa aislada aEPEC *ehxA+* fue previamente una cepa STEC mediante la búsqueda de las secuencias de inserción típicas del fago portador de la toxina Shiga. (Bielaszewska y col., 2007).

Pocos estudios permiten comparar la relación entre patovares STEC y EPEC provenientes de muestras de heces bovinas. En Mendoza sobre 199 muestras se registró una proporción de aislamiento STEC/EPEC de 3/1 (Pizarro y col., 2014). En Brasil, Ribeiro y col. (2019) describen una proporción STEC/EPEC de 3,7/1 en 160 muestras de materia fecal de bovinos de producción lechera. De las 49 cepas STEC, 6 resultaron ser AE-STEC. Por su parte, Orden y col. (2002) obtienen prevalencias similares de STEC y EPEC (8,7% y 8,2% respectivamente) a partir de muestras de materia fecal de ganado sano en España. En Bélgica,

Fakih y col. (2016) obtienen prevalencias levemente mayores de cepas AE-STE C por sobre EPEC (1,5/1), pero hay que tener en cuenta que sus muestras provienen de terneros con diarrea. El análisis de 194 muestras de bovinos nativos de TDF permitió identificar una proporción de muestras positivas potenciales de STE C LEE-negativo de 30/194, de EPEC de 10/194 y de AE-STE C de 0. La relación STE C /EPEC fue 3/1, en coincidencia con los valores obtenidos por Pizarro y col., (2014). Bajo este criterio la probabilidad de exposición a STE C es tres veces mayor que a EPEC, es decir que la probabilidad de infección por STE C con el consecuente desarrollo de diarreas y/o SUH en la población infantil de TDF es tres veces mayor a la probabilidad de infección con EPEC. De estas muestras positivas potenciales aislamos 27 cepas STE C LEE-negativas y una EPEC.

Finalmente, los ensayos de susceptibilidad evidenciaron que todas las cepas analizadas presentaban resistencia a ampicilina. Otros estudios realizados en Latinoamérica mostraron resistencia a ampicilina en la mayoría de las cepas (94% en cepas de Bolivia analizadas por Gonzales y col. en 2013, y 80% en cepas analizadas en Perú por Mosquito y col. en 2012). Con respecto a otros antibióticos, algunas cepas mostraron resistencia o resistencia intermedia a aminoglucósidos, específicamente estreptomina (71%) y amikacina (21%). El consenso definido para evaluar multiresistencia hace foco en primera instancia en patógenos de impacto en el ambiente hospitalario (*Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter* spp.) (Jiménez Pearson y col., 2019). Para los fines de nuestro trabajo se definió como multiresistente a toda cepa que presente resistencia a más de tres familias diferentes de antibióticos. Ninguna cepa analizada presentó estas características.

La resistencia en *E. coli* se desarrolla a partir de mutaciones en los sitios de acción de los antibióticos (ej. resistencia a fluoroquinolonas), por adquisición de elementos genéticos móviles (ej. resistencia a ampicilina o amoxicilina) o por acción enzimática (ej. resistencia a aminoglucósidos) (Ochoa y Gómez-Duarte, 2016). Los mecanismos de resistencia a antimicrobianos que más preocupan a la comunidad científica están asociados a la producción de betalactamasas, en especial carbapenemasas, y al mecanismo de resistencia transferible a colistina (*mcr-1*), que ha sido detectado en cepas aisladas en Argentina (Lazovski y col., 2017). En nuestro estudio, no se detectó resistencia por betalactamasas de espectro extendido, y ninguna cepa manifestó resistencia fenotípica a colistina.

CONCLUSIONES Y PROSPECTIVAS _____

7. CONCLUSIONES

En este trabajo se aislaron cepas STEC y EPEC de bovinos de carne provenientes de feedlot y campo, que ingresaron a playa de faena en Ushuaia y Rio Grande. El análisis de las muestras de bovinos nativos de TDF permitió identificar una proporción de STEC que triplica a EPEC, con ausencia de AE-STECS. Los diferentes aislamientos obtenidos no comparten el gen de virulencia *eae*, por lo cual la intimina, relacionada con la inmunidad cruzada entre ambos patovares, no ha sido detectada en las cepas STEC aisladas. De esta forma, EPEC no contribuiría a la protección frente a los posibles cuadros clínicos que cepas circulantes STEC LEE-negativas provoquen.

En noviembre 2019 se registraron 3 casos de SUH en Rio Grande, en uno de ellos se detectó serología compatible con infección por STEC O157, no así en los otros dos casos. Esto indica que el serotipo O157 circula en la región. Sin embargo en nuestro muestreo dicho serogrupo no fue detectado.

La baja prevalencia de cepas EPEC demostrada en nuestro estudio evitaría el desarrollo de una respuesta inmunológica eficiente ya que la exposición al patógeno no es tan frecuente. Este resultado apoya parte de la hipótesis, en cuanto a que una baja proporción de ganado es portador de EPEC y la baja respuesta inmunológica cruzada conferida por este patovar podría no tener el efecto protector frente a la infección por cepas STEC tanto LEE negativas como AE-STECS y al desarrollo de SUH en la población infantil.

Este es el primer estudio de reservorios en TDF. Sin embargo según los resultados obtenidos, se considera necesaria la realización de nuevas investigaciones planificando un aumento en el número de muestras estudiadas, un análisis particular del ganado en feedlot, estudiando a su vez la situación en el período estival para arribar a resultados concluyentes en cuanto a la identificación de AE-STECS y STEC-LEE negativos.

Los serotipos de las cepas obtenidos en este estudio fueron variados e incluyeron cepas de serogrupos asociados a casos de SUH, tales como O174, de impacto local. Los aislamientos obtenidos fueron todos STEC-LEE negativos. Dichas cepas de riesgo son compatibles con la presentación epidemiológica de nuestro país, en la que los brotes se asocian a casos individuales.

La caracterización de las cepas STEC aisladas pone en evidencia la circulación de subtipos no convencionales de Stx2, identificados en este trabajo como *stx2_{NT}* productoras de toxina Stx2. Dado que este tipo de toxina es más potente que la Stx1, fue detectada en los aislamientos STEC analizados y las cepas circulantes en el ganado nativo de TDF pueden presentar características diferentes a las del ganado continental, surge el interés de analizar

este grupo de aislamientos y compararlos con los aislamientos clínicos presentes en la base nacional de datos para establecer su potencial riesgo.

Si bien no se detectaron cepas multiresistentes, la identificación de patovares de *E. coli* con resistencia a ampicilina y aminoglucósidos en bovinos permite estimar el uso de antimicrobianos en el manejo de los animales. Será necesario establecer si el uso de antimicrobianos en la producción animal de TDF se ajusta a un uso correcto. Dado que El Programa Nacional de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos en animales destinados al consumo humano, (Resolución 591/2015 SENASA) ha comenzado con el monitoreo de niveles de R absolutos en nuestro ganado, nuestros resultados serán transferidos a la oficina de SENASA Patagonia Sur para su evaluación.

8. PROSPECTIVAS

El análisis del reservorio bovino en la isla TDF constituyó un aporte de importancia a la epidemiología de las enfermedades causadas por STEC y EPEC. Sin embargo, teniendo en cuenta las características de las cepas aisladas y las altas tasas de SUH y diarreas agudas en la región, se plantea la necesidad de otros estudios epidemiológicos que incluyan el análisis de otras fuentes de infección y/o reservorios posibles. Asimismo, para el análisis de la situación epidemiológica en la isla de TDF es necesario considerar las costumbres de la comunidad y su percepción de riesgo.

Con respecto a las cepas aisladas, la presencia de subtipos de Stx no tipificables amerita realizar más estudios, y está previsto realizar el análisis del genoma completo. También es importante evaluar la capacidad de adhesión de esta colección de cepas, tanto a partir de ensayos en cultivo celular como con pruebas a nivel molecular (ej. detección de LAA).

Las muestras obtenidas resultaron de un único muestreo en época invernal. Deberían considerarse muestreos seriados para evaluar si las características de las cepas se mantienen, si la temporalidad y el clima afectan su distribución, y analizar si la homología de datos entre animales a campo y a feedlot permanece constante. Es importante mencionar que por motivos económicos y debido al aumento de la población de perros salvajes en la provincia, muchos productores ovinos se están volcando hacia la producción bovina, lo que hace interesante pensar en muestreos futuros y en particular analizar la situación epidemiológica del feedlot, del cual ya se ha planificado el estudio.

También es interesante tener en cuenta que muchos bovinos de TDF terminan su etapa productiva en Trelew, provincia de Chubut. Esta provincia integra a su vez la Región Patagónica

Sur, y también presenta tasas elevadas de SUH. Las tasas altas de enfermedad podrían tener relación con el ingreso de bovinos de TDF y la dispersión de cepas en la región.

ANEXO

MEDIOS DE CULTIVO

- **Agar Mac Conkey (AMC) (Oxoid, CM0007)**

Composición: (g/l)

- Peptona 20,0
- Lactosa 10,0
- Sales Biliares 5,0
- Cloruro de Sodio 5,0
- Rojo neutro 0,075
- Agar 12,0

pH final a 25 °C= 7,4 +/- 0,2

Preparación:

- 1- Resuspender 52 g en 1000 ml de agua destilada.
- 2- Llevar a ebullición en baño de agua hasta disolución completa.
- 3- Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min.
- 4- Dejar enfriar en baño térmico hasta temperatura de 80 °C.
- 5- Dispensar en placas de Petri (20 ml por placa aproximadamente).
- 6- Conservar a 4 °C hasta su utilización.

- **Agar Mac Conkey Sorbitol (SMAC) (Oxoid, CM0813)**

Composición: (g/l)

- Peptona 20,0
- Sorbitol 10,0
- Sales Biliares 1,5
- Cloruro de sodio 5,0
- Rojo neutro 0,03
- Cristal Violeta 0,001
- Agar 15,0

pH final a 25 °C= 7,1 +/- 0,2

Preparación:

- 1- Resuspender 51,5 g en 1000 ml de agua destilada.
- 2- Llevar a ebullición en baño de agua hasta disolución completa.
- 3- Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min.
- 4- Dejar enfriar en baño térmico hasta temperatura de 80 °C.
- 5- Dispensar en placas de Petri (20 ml por placa aproximadamente).
- 6- Conservar a 4 °C hasta su utilización.

- **Caldo tripteína soja (CTS) (Oxoid, CM0129)**

Composición: (g/l)

- Caseína de digestión pancreática 15,0
- Cloruro de sodio 5,0
- Digestión enzimática de porotos de soja 5,0
- Glucosa 5,0
- Fosfato hidrogenado dipotásico 2,5

pH final a 25 °C= 7,3 +/- 0,2

Preparación:

- 1- Resuspender 40 g en 1000 ml de agua destilada.
- 2- Llevar a ebullición hasta disolver completamente.
- 3-Dispensar 5 ml en tubos.
- 4- Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min.
- 5- Dejar enfriar a temperatura ambiente.

- **Caldo tripteína soja con Cefixima-Telurito de potasio (CTS-CT)**

CTS 1000 ml

Cefixima 0,05 mg

Telurito de potasio 2,5 mg

Preparación:

- 1- Permitir que el frasco alcance temperatura ambiente (condiciones de almacenamiento de los frascos sin reconstituir: entre 2 °C y 8 °C).
- 2- Reconstituir en forma aséptica el contenido de 1 frasco con 4 ml de agua destilada estéril.
- 3- Agregar los 4 ml de CT a 1000 ml de CTS estéril.
- 4- Dispensar 5 ml en tubos.

- **Agar glóbulos rojos lavados (AGRL)**

Composición:

Para una placa de Petri (20 ml aproximadamente):

- Agar base triptosa (TBA)⁽¹⁾ 10 ml
- Agar tripteína soja (ATS)⁽²⁾ 10 ml
- Cloruro de calcio 1M⁽³⁾ 0,1 ml
- Glóbulos rojos lavados (GRL) de sangre desfibrinada⁽⁴⁾ de cabra u oveja 5 ml

Preparación:

- 1- Dispensar 10 ml de ATS en cada placa de Petri y dejar solidificar.
- 2- Preparar y esterilizar el medio TBA y mantenerlo a 50 °C.
- 3- Incorporar 0,1 ml de cloruro de calcio al TBA y homogeneizar.
- 4- Incorporar los GRL al TBA y mezclar suavemente con movimientos circulares.
- 5- Agregar 10 ml de TBA+GRL a las placas de Petri.
- 6- Conservar a 4 °C hasta su utilización.
- 7- Utilizar dentro de los 7 días posteriores a su preparación.

(1) Agar base triptosa

Composición: (g/l)

Triptosa 10,0 g

Extracto de carne 3,0 g

Cloruro de sodio 5,0 g

Agar 20 g

Preparación:

- 1- Disolver los componentes en 1 l de agua destilada.
- 2- Llevar a ebullición hasta lograr la disolución completa.
- 3- Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min.
- 4- Dejar enfriar hasta 50 °C.
- 5- Mantener en baño térmico hasta preparar AGRSL y AGRL.

(2) Agar tripteína soja (Oxoid, CMO 131)

Composición: (g/l)

Caseína de digestión pancreática 15,0

Digestión enzimática de porotos de soja 5,0

Cloruro de sodio 5,0

Agar 15,0

Preparación:

- 1- Disolver los componentes en 1 l de agua destilada.
 - 2- Llevar a ebullición hasta lograr la disolución completa.
 - 3- Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min.
- pH final a 25 °C= 7,3 +/- 0,2

(3) Cloruro de calcio 1M

Composición:

Para 10 ml:

Cloruro de calcio 1,11 g

Preparación:

- 1- Disolver el cloruro de calcio en 10 ml de agua destilada.
- 2- Esterilizar con filtro de 0,22 µm.
- 3- Conservar el cloruro de calcio 1M a temperatura ambiente para la preparación de la placa de AGRL.

(4) Obtención de GRL de sangre desfibrinada

- 1- Una vez obtenida la sangre del animal, colocarla inmediatamente en un recipiente de base ancha que contenga una base de perlas de vidrio en su interior.
- 2- Realizar suavemente movimientos circulares a fin de desfibrinar la misma.
- 3- Centrifugar 5 ml de la sangre desfibrinada a 2500 g por 10 min.
- 4- Desechar el plasma.
- 5- Resuspender 1 volumen de glóbulos rojos en 2 volúmenes de PBS estéril obteniendo una suspensión homogénea, cuidando de no lisar los glóbulos rojos.
- 6- Centrifugar a 2500 g por 10 min.
- 7- Repetir 2 veces los pasos 4- 5- y 6-.
- 8- Desechar el sobrenadante.
- 9- Guardar el paquete de glóbulos rojos para la preparación del AGRL.

Nota: Usar sangre fresca.

- **Agar glóbulos rojos sin lavar (AGRSL)**

Composición:

Para una placa de Petri (20 ml aproximadamente):

-Agar Base triptosa (TBA) 20 ml

-Glóbulos rojos sin lavar (GRLSL) de sangre desfibrinada⁽⁵⁾ de cabra u oveja 1 ml

Preparación:

- 1- Preparar y esterilizar el medio TBA y mantenerlo a 50 °C.
- 2- Incorporar los GRSL al TBA y mezclar suavemente con movimientos circulares.
- 3- Dispensar 20 ml en las placas de Petri.
- 4- Conservar a 4 °C hasta su utilización.
- 5- Utilizar dentro de los 7 días posteriores a su preparación.

(5) Obtención de GRSL de sangre desfibrinada

- 1- Una vez obtenida la sangre del animal, colocarla inmediatamente en un recipiente de base ancha que contenga una base de perlar de vidrio en su interior.
- 2- Realizar suavemente movimientos circulares a fin de desfibrinar la misma.
- 3- Centrifugar 5 ml de la sangre desfibrinada a 2500 g por 10 min.
- 4- Desechar el plasma.
- 5- Guardar el paquete de glóbulos rojos para la preparación del AGRSL.

MEDIOS Y TINCIONES PARA ENSAYO CELULAR

- **Medio de cultivo de mantenimiento**

- Medio comercial DMEM Dulbecco's modified Eagle's médium
- HEPES 15 mm/l
- Bicarbonato 2 g/l
- Suero fetal Bovino 10%
- Aminoácidos 50 µl/50 ml
- Antibióticos (sujeto a necesidad)
- PH final 7,1 a 7,2

- **Medio de cultivo de ensayo**

- Medio comercial DMEM Dulbecco's modified Eagle's médium
- HEPES 15 mm/l
- Bicarbonato 0,34 g/l
- Suero fetal Bovino 2%
- Manosa 2%
- PH final 7,1 a 7,2

- **Tinción MAY GRÜNWARD GIEMSA**

- Fijar con metanol 20 min
- Colocar 1 parte MG 1 parte agua 10 min
- Colocar 2 partes de agua 1 parte de Giemsa 20 min
- Observar con microscopio óptico.

SOLUCIONES

- **Solución Salina Bufferada (PBS)**

Composición PBS 0,1 M

Fosfato Dibásico de Sodio Anhidro	2,9 g
Fosfato monobásico de Sodio Anhidro	0,205 g
Cloruro de Sodio	8,18 g
Cloruro de potasio	0,223 g
H ₂ O destilada	1000 ml

pH final a 25 °C= 7 +/- 0,2

- **PBS-tween20 (0,05%)**

PBS 1X	99,5 ml
Tween 20	0,5 ml

Esterilizar en autoclave a 121°C a 15 min.

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

- **Templados**

- Resuspender una anzada de la/s colonia/s seleccionada/s para su análisis en 200 µl de agua bidestilada estéril
- Colocar en baño de agua y hervir durante 10 min
- Centrifugar a 13000 g durante 5 min
- Utilizar el sobrenadante como templado

- **PCR subtipificación Stx**

(1) Subtipificación de stx1

La subtipificación de *stx1* se realizó mediante PCR individuales (*stx1a*, *stx1c* y *stx1d*).

Tabla 5. Mezcla de reactivos para PCR subtipificación *stx1a* y *stx1d*

	Concentración de trabajo del reactivo	Concentración de reactivo en la mezcla	Volumen para una determinación (µl)
H ₂ O			28,3
<i>Buffer</i> *	5X	1x	10
dNTPs c/u	10 mM	0,2 mM	1
<i>Stx1st f</i>	10 µM	0,05 µM	0,25
<i>Stx1st r</i>	10 µM	0,05 µM	0,25
Cl ₂ Mg*	*	1,5 mM	*
Taq	5 U/µl	1 U/50µl	0,2
Volumen final = 40 µl de mezcla de reactivos + 10 µl de templado = 50 µl			

Referencia: En los ensayos se utilizó Go Taq (Promega), cuyo buffer tiene 7,5 mM Cl₂Mg, no se adicionó Cl₂Mg, la concentración final de ensayo fue de 1,5mM Cl₂Mg.

Tabla 6. Mezcla de reactivos para PCR subtipificación *stx1c*

	Concentración de trabajo del reactivo	Concentración de reactivo en la mezcla	Volumen para una determinación (μ l)
H ₂ O			3,75
Hotstart taq mix	0,1 U/ μ l	1 U	10
<i>stx1st f</i>	10 μ M	0,3 μ M	0,625
<i>stx1st r</i>	10 μ M	0,3 μ M	0,625
Volumen final = 15 μ l de mezcla de reactivos + 5 μ l de templado = 20 μ l			

Las reacciones de PCR se realizaron bajo las siguientes condiciones: temperatura inicial de 95 °C durante 5 min, seguido de 35 ciclos de 94 °C durante 50 s, 64 °C (para *stx1a* y *stx1d*) / 66 °C (para *stx1c*) durante 40 s y 72 °C durante 1 min y un paso final de 72 °C durante 3 min, manteniéndose a 4 °C hasta su posterior análisis.

(2) Subtipificación de *stx2*

Para la subtipificación de *stx2* se realizaron 7 PCRs individuales (*stx2a*, *stx2b*, *stx2c*, *stx2d*, *stx2e*, *stx2f* y *stx2g*).

Tabla 7. Mezcla de reactivos para PCR subtipificación *stx2a*

	Concentración de trabajo del reactivo	Concentración de reactivo en la mezcla	Volumen para una determinación (µl)
H ₂ O			8,625
<i>Buffer</i> *	5x	1x	4
dNTPs c/u	10 mM	0,2 mM	0,4
<i>stx2a</i> -F2	10 µM	0,3 µM	0,625
<i>stx2a</i> -R2	10 µM	0,3 µM	0,625
<i>stx2a</i> -R3	10 µM	0,3 µM	0,625
Cl ₂ Mg*	*	1,5 mM	*
Taq	5 U/µl	0,5 U/20µl	0,1
Volumen final = 15 µl de mezcla de reactivos + 5 µl de templado = 20 µl			

Referencia: En los ensayos se utilizó Go Taq (Promega).

La PCR se realizó bajo las siguientes condiciones: temperatura inicial de 95 °C durante 5 min, seguido de 35 ciclos de 94 °C durante 50 s, 66 °C durante 40 s y 72 °C durante 1 min y un paso final de 72 °C durante 3 min, manteniéndose a 4 °C hasta su posterior análisis.

Tabla 8. Mezcla de reactivos para PCR subtipificación *stx2b*, *stx2e*, *stx2f*, *stx2g*

	Concentración de trabajo del reactivo	Concentración de reactivo en la mezcla	Volumen para una determinación (µl)
H ₂ O			9,25
<i>Buffer</i> *	5x	1x	4
dNTPs c/u	10 mM	0,2 mM	0,4
<i>stx2 st f</i>	10 µM	0,3 µM	0,625
<i>stx2 st r</i>	10 µM	0,3 µM	0,625
Cl ₂ Mg*	*	1,5 mM	*
Taq	5 U/µl	0,5 U/20 µl	0,1
Volumen final = 15 µl de mezcla de reactivos + 5 µl de templado = 20 µl			

Referencia: En los ensayos se utilizó Go Taq (Promega)

Se utilizó el programa de amplificación indicado para *stx2a*.

Tabla 9. Mezcla de reactivos para PCR subtipificación *stx2c*

	Concentración de trabajo del reactivo	Concentración de reactivo en la mezcla	Volumen para una determinación (μ l)
H ₂ O			3,75
Hotstart taq mix	0,1 U/ μ l	1 U	10
<i>stx2 st f</i>	10 μ M	0,3 μ M	0,625
<i>stx2 st r</i>	10 μ M	0,3 μ M	0,625
Volumen final = 15 μ l de mezcla de reactivos + 5 μ l de templado = 20 μ l			

Se utilizó el programa de amplificación indicado para *stx2a*.

Tabla 10. Mezcla de reactivos para PCR subtipificación *stx2d*

	Concentración de trabajo del reactivo	Concentración de reactivo en la mezcla	Volumen para una determinación (μ l)
H ₂ O			8
<i>Buffer</i> *	5x	1x	4
dNTPs c/u	10 mM	0,2 mM	0,4
<i>stx2d</i> -F1	10 μ M	0,3 μ M	0,625
<i>stx2d</i> -R1	10 μ M	0,3 μ M	0,625
<i>stx2d</i> -R2	10 μ M	0,3 μ M	0,625
<i>stx2d</i> -O55-R	10 μ M	0,3 μ M	0,625
Cl ₂ Mg*	*	1,5 mM	*
Taq	5 U/ μ l	0,5 U/25 μ l	0,1
Volumen final = 15 μ l de mezcla de reactivos + 5 μ l de templado = 20 μ l			

Referencia: En los ensayos se utilizó Go Taq (Promega)

La PCR se realizó bajo las siguientes condiciones: temperatura inicial de 95 °C durante 5 min, seguido de 35 ciclos de 94 °C durante 50 s, 64 °C durante 40 s y 72 °C durante 1 min y un paso final de 72 °C durante 3 min, manteniéndose a 4 °C hasta su posterior análisis.

- PCR *bfp*

Tabla 12. Mezcla de reactivos para PCR *bfpA*

	Concentración de trabajo del reactivo	Concentración de reactivo en la mezcla	Volumen para una determinación (μl)
H ₂ O			15,38
Buffer*	5x	1x	5
dNTPs	10 mM	0,2 mM	0,5
<i>bfpAf</i>	10 μM	0,2 μM	0,5
<i>bfpAr</i>	10 μM	0,2 μM	0,5
Cl ₂ Mg*	25 mM	2 mM	0,5
Taq	5 U/μl	0,6 U/25 μl	0,12
Volumen final = 22,5 μl de mezcla de reactivos + 2,5 μl de templado = 25 μl			

Referencia: En los ensayos se utilizó Go Taq (Promega)

La PCR se realizó bajo las siguientes condiciones: temperatura inicial de 94 °C durante 5 min, seguido de 29 ciclos de 94 °C durante 30 s, 60°C durante 1 min y 72 °C durante 2 min, con un paso final de 72 °C durante 7 min, manteniéndose a 4 °C hasta su posterior análisis.

- PCR *saa*

Tabla 14. Mezcla de reactivos para PCR *saa*

	Concentración de trabajo del reactivo	Concentración de reactivo en la mezcla	Volumen para una determinación (µl)
H ₂ O			16,78
Buffer*	5x	1x	5
dNTPs	10 mM	0,2 mM	0,5
<i>saaf</i>	10 µM	0,12 µM	0,3
<i>saar</i>	10 µM	0,12 µM	0,3
Cl ₂ Mg*	*	1,5 mM	-
Taq	5 U/µl	0,6 U/25 µl	0,12
Volumen final = 23 µl de mezcla de reactivos + 2 µl de templado = 25 µl			

Referencia: En los ensayos se utilizó Go Taq (Promega)

La PCR se realizó bajo las siguientes condiciones: temperatura inicial de 94 °C durante 5 min, seguido de 30 ciclos de 94 °C durante 30 s, 55°C durante 30 s y 72 °C durante 30 s, con un paso final de 72 °C durante 7 min, manteniéndose a 4 °C hasta su posterior análisis.

- PCR *aggR*

Tabla 15. Mezcla de reactivos para PCR *aggR*

	Concentración de trabajo del reactivo	Concentración de reactivo en la mezcla	Volumen para una determinación (μl)
H ₂ O			12,4
Buffer*	5x	1x	5
dNTPs	10 mM	0,2 mM	0,5
<i>aggR</i> 09	10 μM	0,8 μM	0,2
<i>aggR</i> 10	10 μM	0,8 μM	0,2
Cl ₂ Mg*	25 mM	3 mM	1,5
Taq	5 U/μl	1 U/25 μl	0,2
Volumen final = 20 μl de mezcla de reactivos + 5 μl de templado = 25 μl			

Referencia: En los ensayos se utilizó Go Taq (Promega)

La PCR se realizó bajo las siguientes condiciones: temperatura inicial de 94 °C durante 5 min, seguido de 25 ciclos de 94 °C durante 30 s, 56°C durante 1 min y 72 °C durante 45 s, con un paso final de 72 °C durante 10 min, manteniéndose a 4 °C hasta su posterior análisis.

- PCR *aaiC*

Tabla 16. Mezcla de reactivos para PCR *aaiC*

	Concentración de trabajo del reactivo	Concentración de reactivo en la mezcla	Volumen para una determinación (µl)
H ₂ O			12,88
Buffer*	5x	1x	5
dNTPs	10 mM	0,2 mM	0,5
<i>aaiC</i> F	10 µM	0,2 µM	0,5
<i>aaiC</i> R	10 µM	0,2 µM	0,5
Cl ₂ Mg*	25 mM	2 mM	0,5
Taq	5 U/µl	0,6 U/25 µl	0,12
Volumen final = 20 µl de mezcla de reactivos + 5 µl de templado = 25 µl			

Referencia: En los ensayos se utilizó Go Taq (Promega)

La PCR se realizó bajo las siguientes condiciones: temperatura inicial de 94 °C durante 5 min, seguido de 35 ciclos de 94 °C durante 50 s, 57°C durante 1 min 30 s y 72 °C durante 1 min 30 s, con un paso final de 72 °C durante 5 min, manteniéndose a 4 °C hasta su posterior análisis.

- PCR *elt* y *est*

Tabla 17. Mezcla de reactivos para PCR *etl/ est*

	Concentración de trabajo del reactivo	Concentración de reactivo en la mezcla	Volumen para una determinación (µl)
H ₂ O			15,73
Buffer*	5x	1x	5
dNTPs	10 mM	0,1 mM	0,25
<i>elt</i> 9	10 µM	0,08 µM	0,2
<i>elt</i> 10	10 µM	0,08 µM	0,2
Cl ₂ Mg*	25 mM	2 mM	0,5
Taq	5 U/µl	0,6 U/25 µl	0,12
Volumen final = 22 µl de mezcla de reactivos + 3 µl de templado = 25 µl			

Referencia: En los ensayos se utilizó Go Taq (Promega)

La PCR se realizó bajo las siguientes condiciones: temperatura inicial de 94 °C durante 5 min, seguido de 25 ciclos de 94 °C durante 1 min, 48°C durante 1 min 30 s y 72 °C durante 2 min, con un paso final de 72 °C durante 5 min, manteniéndose a 4 °C hasta su posterior análisis.

- PCR *invE*

Tabla 18. Mezcla de reactivos para PCR *invE*

	Concentración de trabajo del reactivo	Concentración de reactivo en la mezcla	Volumen para una determinación (µl)
H ₂ O			15,23
Buffer*	5x	1x	5
dNTPs	10 mM	0,1 mM	0,25
<i>invE9</i>	10 µM	0,08 µM	0,2
<i>invE10</i>	10 µM	0,08 µM	0,2
Cl ₂ Mg*	*	1,5 mM	-
Taq	5 U/µl	0,6 U/25 µl	0,12
Volumen final = 21 µl de mezcla de reactivos + 4 µl de templado = 25 µl			

Referencia: En los ensayos se utilizó Go Taq (Promega)

La PCR se realizó bajo las siguientes condiciones: temperatura inicial de 94 °C durante 5 min, seguido de 25 ciclos de 94 °C durante 1 min, 48°C durante 1 min 30 s y 72 °C durante 2 min, con un paso final de 72 °C durante 5 min, manteniéndose a 4 °C hasta su posterior análisis.

- PCR *daa*

Tabla 19. Mezcla de reactivos para PCR *daaE*

	Concentración de trabajo del reactivo	Concentración de reactivo en la mezcla	Volumen para una determinación (µl)
H ₂ O			13,73
Buffer*	5x	1x	5
dNTPs	10 mM	0,1 mM	0,25
<i>daaEf</i>	10 µM	0,08 µM	0,2
<i>daaEr</i>	10 µM	0,08 µM	0,2
Cl ₂ Mg*	25 mM	2 mM	0,5
Taq	5 U/µl	0,6U/25 µl	0,12
Volumen final = 20 µl de mezcla de reactivos + 5 µl de templado = 25 µl			

Referencia: En los ensayos se utilizó Go Taq (Promega)

- PCR *ehxA*

Tabla 20. Mezcla de reactivos para PCR *ehxA*

	Concentración de trabajo del reactivo	Concentración de reactivo en la mezcla	Volumen para una determinación (μ l)
H ₂ O			15,08
Buffer*	5x	1x	5
dNTPs	10 mM	0,2 mM	0,5
<i>ehxA</i> F	10 μ M	0,16 μ M	0,4
<i>ehxA</i> R	10 μ M	0,16 μ M	0,4
Cl ₂ Mg*	25 mM	2 mM	0,5
Taq	5 U/ μ l	0,6 U/25 μ l	0,12
Volumen final = 22 μ l de mezcla de reactivos + 3 μ l de templado = 25 μ l			

Referencia: En los ensayos se utilizó Go Taq (Promega)

La PCR se realizó bajo las siguientes condiciones: temperatura inicial de 94 °C durante 4 min, seguido de 10 ciclos de 94 °C durante 1 min, 65°C durante 1 min y 72 °C durante 1 min 30 s; luego tienen lugar 15 ciclos de 94 °C durante 1 min, 65°C durante 2 min y 72 °C durante 1 min 30 s, seguidos de 10 ciclos de 94 °C durante 1 min, 60°C durante 2 min y 72 °C durante 2 min 30 s. El paso final fue 72 °C durante 5 min, manteniéndose a 4 °C hasta su posterior análisis.

Protocolos adicionales subtipificación *stx1*

- **Tabla 22.** Mezcla de reactivos para PCR subtipificación *stx1a*

	Concentración de trabajo del reactivo	Concentración de reactivo en la mezcla	Volumen para una determinación (μ l)
H2O			3,75
Hotstart taq mix	0,1 U/ μ l	1 U	10
<i>stx1a</i> F	10 μ M	0,3 μ M	0,625
<i>stx1a</i> R	10 μ M	0,3 μ M	0,625
Volumen final = 15 μ l de mezcla de reactivos + 5 μ l de templado = 20 μ l			

- Mezcla de reactivos para PCR subtipificación *stx1c* descrita en **tabla 6**
- **Tabla 23.** Mezcla de reactivos para PCR subtipificación *stx1d*

	Concentración de trabajo del reactivo	Concentración de reactivo en la mezcla	Volumen para una determinación (μ l)
H2O			3,75
Hotstart taq mix	0,1 U/ μ l	1 U	10
<i>stx1d</i> F	10 μ M	0,3 μ M	0,625
<i>stx1d</i> R	10 μ M	0,3 μ M	0,625
Volumen final = 15 μ l de mezcla de reactivos + 5 μ l de templado = 20 μ l			

Las reacciones de PCR se realizaron bajo las siguientes condiciones: temperatura inicial de 95 °C durante 5 min, seguido de 35 ciclos de 94 °C durante 50 s, 64 °C (para *stx1a* y *stx1d*) / 66 °C (para *stx1c*) durante 40 s y 72 °C durante 1 min y un paso final de 72 °C durante 3 min, manteniéndose a 4 °C hasta su posterior análisis

Protocolos adicionales subtipificación *stx2*

- **Tabla 24.** Mezcla de reactivos para PCR subtipificación *stx2a*

	Concentración de trabajo del reactivo	Concentración de reactivo en la mezcla	Volumen para una determinación (µl)
H2O			3,125
Hotstart taq mix	0,1 U/ µl	1 U	10
<i>stx2a</i> F2	10 µM	0,3 µM	0,625
<i>stx2a</i> R3	10 µM	0,3 µM	0,625
<i>stx2a</i> R4	10 µM	0,3 µM	0,625
Volumen final = 15 µl de mezcla de reactivos + 5 µl de templado = 20 µl			

- **Tabla 25.** Mezcla de reactivos para PCR subtipificación *stx2b*

	Concentración de trabajo del reactivo	Concentración de reactivo en la mezcla	Volumen para una determinación (µl)
H2O			3,75
Hotstart taq mix	0,1 U/ µl	1 U	10
<i>stx2b</i> F	10 µM	0,3 µM	0,625
<i>stx2b</i> R	10 µM	0,3 µM	0,625
Volumen final = 15 µl de mezcla de reactivos + 5 µl de templado = 20 µl			

- Mezcla de reactivos para PCR subtipificación *stx2c* descrita en **Tabla 9**

La PCR se realizó bajo las siguientes condiciones: temperatura inicial de 95 °C durante quince min, seguido de 35 ciclos de 94 °C durante 50 s, 66 °C durante 40 s y 72 °C durante 1 min y un paso final de 72 °C durante 3 min, manteniéndose a 4 °C hasta su posterior análisis.

- **Tabla 27.** Protocolo de subtipificación de *stx2* propuesto por Tyler

	Concentración de trabajo del reactivo	Concentración de reactivo en la mezcla	Volumen una determinación (µl)
H ₂ O			31,75
<i>Buffer</i> *	5x	1x	10
dNTPs c/u	10 mM	0,2 µM	1
VT2c	10 µM	0,2 µM	1
VT2d	10 µM	0,2 mM	1
Cl ₂ Mg*	*	1,5 mM	-
Taq	5 U/µl	0,25 U/50µl	0,25
Volumen final = 45 µl de mezcla de reactivos + 5 µl de templado = 50 µl			

Referencia: En los ensayos se utilizó Go Taq (Promega)

La PCR se realizó bajo las siguientes condiciones: temperatura inicial de 94 °C durante cinco min, seguido de 30 ciclos de 94 °C durante dos min, 55 °C durante 1 min y 72 °C durante 1 min y un paso final de 72 °C durante 7 min.

Se utilizaron 10 µl de los productos obtenidos para realizar la electroforesis en gel de agarosa y comprobar la presencia de amplicones. Se realizó digestión enzimática del producto de PCR. Se mezclaron 10 µl del producto de PCR con 18 µl de H₂O, 2 µl de buffer y 1 µl de la enzima correspondiente. El protocolo se realizó para cada una de las enzimas: Hae III, Rsa I y Bcn I. Las mezclas por cada muestra se incubaron durante dos h a 37°C, y luego se sometieron nuevamente a corrida electroforética.

La interpretación de resultados correspondió a las diferentes variantes tal como se detalla en la **tabla 28**.

- **Tabla 28.** Patrón de interpretación de PCR-RFLP

Tamaño del los fragmentos (pb)			
Enzima de restricción	<i>stx2</i>	<i>stx2ha</i>	<i>stx2hb</i>
Hae III	285	161, 124	161, 124
Rsa I	216, 69	136, 80, 69	216, 69

Nci I	285	285	159, 126
-------	-----	-----	----------

CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y PRUEBAS BIOQUÍMICAS

- **Tinción de Gram**

- Cristal violeta 1 min
- Ecurrir y enjuagar con agua corriente
- Lugol 1 min
- Ecurrir y enjuagar con agua corriente
- Alcohol 20 s
- Ecurrir y enjuagar con agua corriente
- Safranina 1 min
- Ecurrir y enjuagar con agua corriente
- Secar con papel

- **Evaluación de Movilidad**

Para esta prueba se utilizó medio SIM (Britania B0213106), medio semisólido destinado a verificar movilidad, producción de Indol y producción de sulfuro de hidrógeno por parte de los microorganismos. Se realizó siembra de las cepas de interés por punción, y la movilidad se evidenció cuando el microorganismo logró crecer más allá de la línea de siembra.

• **Tabla 32.** Pruebas bioquímicas y sus fundamentos

Prueba	Principio	Procedimientos			
		Medio de cultivo	Reactivo/indicador	Incubación	Lectura
Catalasa.	Detección de la enzima catalasa que rompe uniones peróxido.	Agar infusión.	H ₂ O ₂ colocar unas gotas sobre el portaobjetos con una muestra del cultivo	-	Formación de burbujas por desprendimiento de O ₂ : +
Oxidasa.	Detección de la enzima citocromo oxidasa en la cadena respiratoria.	Agar infusión.	Disco con oxalato de dimetil -p -metilanilina. Colocar en una suspensión densa del cultivo.	1 a 5 min.	Cambio de color a morado intenso.
OF Oxido fermentación.	Determinación del metabolismo oxidativo o fermentativo.	Medio semi sólido con glucosa.	Indicador de pH. Uso de 2 tubos, uno de ellos con Vaselina.	24 hs	Viraje en todo el medio: fermentador. Viraje en la superficie del medio: oxidativo.
Fermentación de los Hidratos de Carbono.	Fermentación de un carbohidrato específico, produciendo ácido o ác. y gas.	Medio basal al que se le incorpora el hidrato de carbono a evaluar.	Ázucar a evaluar/ indicador de pH y campanita de Durham.	48 hs	Viraje del color del medio por la acidez, captura de gas en la campanita.
Rojo de metilo (RM).	Utilización de la glucosa por la vía fermentativa ácido mixta. Determina un pH < 4,5 final.	Caldo RMVP (Solo contiene glucosa).	RM (Indicador de pH).	48 hs	1 gota de cultivo + 1 gota de indicador: Rojo:+ Amarillo:-
Voges Proskauer (VP).	Utilización de la glucosa por la vía fermentativa del butilenglicol con pH final neutro. Se pone de manifiesto el producto intermedio: acetoína, que tiene reacción reversible con butilenglicol.	Caldo RMVP (Solo contiene glucosa).	α-naftol + KOH al 40%. Calentar levemente.	48 hs	Rojo ladrillo:+ 5 min agitar o calentar levemente para oxidar y forzar la aparición del metabolito intermedio.Sin cambio de color : -
Citrato.	Medio sintético definido. Utilización como única fuente de C.	Citrato de Koser o de Simmons.	Indicador de pH.	48 hs	Celeste: + Verde: -
Indol.	Detección de la enzima triptofanasa: Producción de indol a partir de triptofano.	Agua de peptona (alto contenido de triptofano)	Reactivo de Erlich o de Kovacs.	48 hs	Cambio de color en el reactivo Rojo:+ Incoloro:-

PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD: MEDIDAS DE LOS HALOS

- **Tabla 35.** Medidas de halos en antibiograma por difusión

ID	Ampicilina	Amikacina	Ac Nalidixico	Ciprofloxacina	Cloranfenicol	Gentamicina	Norfloxacina	Streptomicina	Tetraciclina	Trimetoprim Sulfa
Puntos de corte	≥17; 14-16; ≤13	≥17; 15-16; ≤14	≥19; 14-18; ≤13	≥21; 16-20; ≤15	≥18; 13-17; ≤12	≥15; 13-14; ≤14	≥17; 13-16; ≤12	≥15; 12-14; ≤11	≥15; 12-14; ≤11	≥16; 11-15; ≤10
5fRG	0	22	25	36	22	30	30	16	20	30
8fRG	0	21	20	30	20	26	32	14	20	25
11fRG	0	21	26	35	22	26	36	14	24	30
16fRG	0	20	23	35	20	24	36	12	22	25
24fRG II	0	22	24	37	22	26	36	16	24	28
24fRG III	0	21	24	36	25	30	38	20	24	30
63fRG	0	22	20	36	23	26	32	14	20	25
64fRG	0	20	21	28	24	26	30	14	20	23
66fRG I	0	16	22	26	20	24	24	14	20	28
66fRG III	0	0?	21	23	20	18	20	10	20	26
74fRG	0	15	20	24	25	22	24	12	20	26
85fRG 1Xa	0	15	22	26	25	22	24	10	22	28
85fRG 1Vd	0	10	23	30	25	25	24	12	20	30
100fR G	0	10	24	26	23	24	30	12	20	30
114fR G III	0	19	22	27	23	26	34	12	23	28
114fR G IV	0	20	21	27	22	26	28	15	23	28
120fR G	0	21	22	26	24	25	26	13	23	28
123fR G II	0	20	21	28	25	24	26	14	21	26
123fR G III	0	20	21	24	20	24	24	15	22	26
93fRG	0	19	21	26	24	27	26	16	24	29
44cR G	0	20	21	25	24	22	24	13	22	26
51cR G	0	20	20	25	24	25	25	13	21	28
56cR G	0	20	20	25	20	24	24	14	22	26
U13	0	19	22	28	20	24	24	14	22	27
U17	0	24	23	30	28	24	24	15	24	28
U27	0	20	24	26	24	24	23	14	22	28
U41 I	0	19	20	28	22	23	23	15	21	25
U41 V	0	20	20	27	24	23	26	14	24	24

- **Tabla 36.** Medidas de halos en antibiograma por difusión de evaluación de betalactamasas de espectro extendido

ID	Amoxicilina Clavulánico	Ceftazidima	Cefotaxima	Meropenem	Imipinem
HALO	≥18; 14-17; ≤13	≥21; 18-20; ≤17	≥26; 23-25; ≤22	≥23; 20-22; ≤19	≥23; 20-22; ≤19
5fRG	20	25	30	28	30
8fRG	22	26	30	28	26
11fRG	20	28	30	28	28
16fRG	20	28	30	30	26
24fRG II	20	26	30	28	26
24fRG III	22	26	28	28	26
63fRG	18	28	30	30	26
64fRG	16	26	30	28	25
66fRG I	20	26	30	28	24
66fRG III	20	28	30	30	28
74fRG	22	26	30	28	28
85fRG 1Xa	21	28	30	30	25
85fRG 1Vd	24	24	26	28	25
100fRG	21	24	28	32	26
114fRG III	21	28	26	32	26
114fRG IV	23	28	30	23	30
120fRG	20	25	28	28	25
123fRG II	18	30	30	32	28
123fRG III	21	24	28	30	28
93fRG	18	25	28	28	25
44cRG	21	28	26	28	26
51cRG	22	28	28	28	26
56cRG	21	28	28	30	28
U13	22	30	32	30	26
U17	24	30	30	32	28
U27	20	25	30	28	26
U41 I	20	28	32	30	25
U41 V	21	26	26	30	26

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Acuña, P.; Rojas, N.; Florentin, M.; Rodriguez, F. (2019). Estandarización de una técnica de PCR múltiple para la detección de los serogrupos O157, O104 y “big six” de *Escherichia coli* productora de la toxina Shiga (STEC). Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, 17(2): 71-76.
- Ahmed, N.; Dobrindt, U.; Hacker, J.; Hasnain, S.E. (2008). Genomic fluidity and pathogenic bacteria: applications in diagnostics, epidemiology and intervention. Nature Reviews Microbiology, 6 (5): 387-94.
- Aidar-Ugrinovich, L.; Blanco, J.; Blanco, M.; Blanco, J.E.; Leomil, L.; Dahbi, G.; Mora, A.; Onuma, D.L.; Silveira, W.D.; Pestana de Castro, A.F. (2007). Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) isolated from calves in São Paulo, Brazil. International Journal of Food Microbiology, 115 (3): 297-306.
- Alonso, M.Z.; Sanz, M.E.; Padola, N.L.; Lucchesi, P.M.A. (2014). Caracterización de cepas de *Escherichia coli* enteropatogénico (EPEC) aisladas durante el proceso de faena de pollos. Revista Argentina de Microbiología, 46(2): 122-125.
- Amigo, N.; Mercado, E.; Bentancor, A.; Singh, P.; Vilte, D.; Gerhardt, E.; Zotta, E.; Ibarra, C.; Manning, S.D.; Larzábal, M.; Cataldi, A. (2015). Clade 8 and Clade 6 Strains of *Escherichia coli* O157:H7 from Cattle in Argentina have Hypervirulent-Like Phenotypes. PLoS One, 10(6): e0127710.
- Bai, X.; Zhang, J.; Ambikan, A.; Jernberg, C.; Ehricht, R.; Scheutz, F.; Xiong, Y.; Matussek, A. (2019). Molecular Characterization and Comparative Genomics of Clinical Hybrid Shiga Toxin-Producing and Enterotoxigenic *Escherichia coli* (STEC/EPEC) Strains in Sweden. Scientific reports, 9 (1): 5619.
- Bentancor, A.; Vilte, D.A.; Rumi, M.V.; Carbonari, C.C.; Chinen, I.; Larzábal, M.; Cataldi, A.; Mercado E.C. (2010). Characterization of non -Shiga toxin- producing *Escherichia coli* O157 strains isolated from dogs. Revista Argentina de Microbiología, 42: 46-48.
- Beutin, L.; Fach, P. (2014). Detection of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* from Nonhuman Sources and Strain Typin. Microbiology Spectrum, 2 (4): EHEC-0001-2013.
- Beutin, L.; Gleier, K.; Kontny, I.; Echeverria, P.; Scheutz, F. (1997). Origin and characteristics of enteroinvasive strains of *Escherichia coli* (EIEC) isolated in Germany. Epidemiology & Infection 118: 199–205
- Beutin, L.; Geier, D.; Steinrück, H.; Zimmermann, S.; Scheutz, F. (1993). Prevalence and

some properties of verotoxin (Shiga-like toxin)-producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy domestic animals. *Journal of Clinical Microbiology*, 31 (9): 2483-8.

- Beutin, L.; Geier, D.; Zimmermann, S.; Karch, H. (1995). Virulence markers of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* strains originating from healthy domestic animals of different species. *Journal of Clinical Microbiology*, 33 (3): 631–635.
- Beutin, L.; Montenegro, M.A.; Orskov, I.; Orskov, F.; Prada, J.; Zimmermann, S.; Stephan, R. (1989). Close association of verotoxin (Shiga-like toxin) production with enterohemolysin production in strains of *Escherichia coli*. *Journal Clinical Microbiology*, 27 (11): 2559–2564.
- Beutin, L.; Zimmermann, S.; Gleier, K. (1996). Rapid detection and isolation of Shiga-like toxin (verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* by direct testing of individual enterohemolytic colonies from washed sheep blood agar plates in the VTEC-RPLA assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 34 (11): 2812-4.
- Bielaszewska, M., Friedrich, A. W., Aldick, T., Schurk-Bulgrin, R., and Karch, H. (2006). Shiga toxin activatable by intestinal mucus in *Escherichia coli* isolated from humans: predictor for a severe clinical outcome. *Clinical Infectious Diseases*, 43, 1160–1167.
- Bielaszewska, M.; Prager, R.; Köck, R.; Mellmann, A.; Zhang, W.; Tschäpe, H.; Tarr, P.I.; Karch, H. (2007). Shiga Toxin Gene Loss and Transfer In Vitro and In Vivo during Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26 Infection in Humans. *Applied and Environmental Microbiology* 73(10): 3144–3150.
- Bielaszewska, M.; Stoewe, F.; Fruth, A.; Zhang, W.; Prager, R.; Brockmeyer, J.; Mellmann, A.; Karch, H.; Friedrich, A.W. (2009). Shiga Toxin, cytolethal distending toxin, and hemolysin repertoires in clinical *Escherichia coli* O91 isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 47: 2061-66.
- Blanco, M.; Blanco, J.E.; Blanco, J.; Gonzalez, E.A.; Mora, A.; Prado, C.; Fernández, L.; Rio, M.; Ramos, J.; Alonso, M.P. (1996). Prevalence and characteristics of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and other verotoxin-producing *E. coli* in healthy cattle. *Epidemiology & Infection*, 117 (2): 251-7.
- Blanco, M.; Blanco, J.E.; Mora, A.; Dahbi, G.; Alonso, M.P.; González, E.A.; Bernárdez, M.I.; Blanco, J. (2004) Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga Toxin (Verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from cattle in Spain and identification of a new intimin variant gene (*eae*). *Journal of Clinical Microbiology*, 42: 645-51.
- Blanco Crivelli, X.; Vasquez Pinochet, S.; Broglio, A.; Bonino, M.P.; Petrina, J.; Disalvo V.; Bentancor, A. (2018). Detección de Shiga toxina 1 y 2 en muestras de ovinos de Tierra

del Fuego. II Congreso Internacional de Zoonosis y IX Congreso Argentino de Zoonosis. Buenos Aires, julio 2018.

- Boisen, N.; Scheutz, F.; Rasko, D.A.; Redman, J.C.; Persson, S.; Simon, J.; Kotloff, K.L.; Levine, M.M.; Sow, S.; Tamboura, B.; Toure, A.; Malle, D.; Panchalingam, S.; Krogfelt, K.A.; Nataro, J.P. (2012). Genomic characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* from children in Mali. *The Journal of Infectious Diseases*, 205 (3): 431–444.
- Boletín Integrado de Vigilancia N222-SE30 (2014) Informe Especial I: Síndrome urémico hemolítico (SUH) en Argentina, 2010 – 2013, pp. 92 – 103.
<https://www.argentina.gob.ar/salud/epidemiologia/boletines2014>; consultado 07/2019.
- Boletín Integrado de Vigilancia N335 SE45 (2016). VIGILANCIA INTEGRADA DE Vigilancia integrada de Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) pp. 41-50.
<https://www.argentina.gob.ar/salud/epidemiologia/boletines2016>; consultado 07/2019.
- Boletín Integrado de Vigilancia N344 SE03 (2017). Vigilancia integrada de Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) pp. 44-49.
<https://www.argentina.gob.ar/salud/epidemiologia/boletines2017>; consultado 07/2019.
- Boletín Integrado de Vigilancia N394 SE02 (2018). Vigilancia integrada de Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) pp. 48-52.
<https://www.argentina.gob.ar/salud/epidemiologia/boletines2018>; consultado 07/2019.
- Boletín Integrado de Vigilancia N459 SE30 (2019). Actualización semanal de la situación de eventos priorizados. Vigilancia de Síndrome Urémico Hemolítico pp. 49-54.
<https://www.argentina.gob.ar/salud/epidemiologia/boletines2019>; consultado 07/2019.
- Brusa, V.; Restovich, V.; Galli, L.; Teitelbaum, D.; Signorini, M., Brasesco, H., Londero, A.; García, D.; Padola, N.L.; Superno, V.; Sanz, M.; Petroli, S.; Costa, M.; Bruzzone, M., Sucari, A.; Ferreghini, M.; Linares, L. Suberbie, G.; Rodriguez, R.; Leotta, G.A. (2017). Isolation and characterization of non – O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from beef carcasses, cuts and trimmings of abattoirs in Argentina. *PLoS One*, 2017 12(8):e0183248.
- Buvens, G., Lauwers, S., and Pierard, D. (2010). Prevalence of subtilase cytotoxin in verocytotoxin-producing *Escherichia coli* isolated from humans and raw meats in Belgium. *Eur. Journal Clinical Microbiology Infectious Diseases*, 29, 1395–1399.
- Calderon Toledo, C.; Arvidsson, I.; Karpman, D. (2011). Cross-reactive protection against enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection by enteropathogenic *E. coli* in a mouse model.

Infection and Immunity, 79 (6): 2224-33.

- Cantey, J.R.; Moseley, S.L. (1991). HeLa cell adherence, actin aggregation, and invasion by non enteropathogenic *Escherichia coli* possessing the *eae* gene. *Infection and Immunity*, (11): 3924-9.
- Carbonari, C.C.; Deza, N.; Flores, M.; Gasparini, A.; Manfredi, E.; Rivas, M. (2014) First isolation of enteroaggregative *Escherichia coli* O104:H4 from a diarrhea case in Argentina. *Revista Argentina Microbiología*, 46 (4):302-6.
- Carbonari, C.C.; Ricciardi, M.; Calvo, A.R.; Montes, A.; Deza, N.L.; Conde Valentino, M.A.; Zolezzi, G.; Baschkier, A.; Vago, M.; Acosta, D.; Manfredi, E.A.; Miliwebsky, E.S.; Chinen, I.; Rivas, M. (2019) An Stx-EAEC O59:NM[H19] strain isolated from a hemolytic uremic syndrome case in Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*, S0325-7541 (19) 30052-5.
- Cheasty, T.; Rowe, B. (1983). Antigenic Relationships Between the Enteroinvasive *Escherichia coli* O Antigens O28ac, O112ac, O124, O136, O143, O144, O152, and O164 and Shigella O Antigens. *Journal of Clinical Microbiology* 17(4):681-4.
- Clements, A.; Young, J.C.; Constantinou, N.; Frankel, G. (2012). Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Gut Microbes*, 3(2): 71-87.
- Cookson, A.L.; Bennett, J.; Thomson-Carter, F.; Attwood, G.T. (2007). Molecular Subtyping and Genetic Analysis of the Enterohemolysin Gene (*ehxA*) from Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* and Atypical Enteropathogenic *E. coli*. *Applied and Environmental Microbiology* 73(20):6360-9
- Coombes, B.K.; Wickham, M.E; Mascarenhas, M.; Gruenheid, S.; Finlay, B.B.; Karmali, M.A. (2008). Molecular analysis as an aid to assess the public health risk of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 74 (7): 2153–2160.
- Cundon, C.; Carbonari C. C.; Zolezzi, G.; Rivas, M.; Bentancor, A. (2018). Putative virulence factors and clonal relationship of O174 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from human, food and animal sources. *Veterinary Microbiology*, 215: 29-34.
- da Silva, L.C.; de Mello Santos, A.C.; Silva, R.M. (2017). Uropathogenic *Escherichia coli* Pathogenicity Islands and Other ExPEC Virulence Genes May Contribute to the Genome Variability of Enteroinvasive *E. coli*. *BMC Microbiology* 17 (1):68.
- De Toni, F., de Souza, E. M., Pedrosa, F. O., Klassen, G., Irino, K., Un Rigo, L.; Steffens, M.B.R.; Fialho, O.B.; Farah, S.M.S.S.; Fadel-Picheth, C.M.T. (2009). A prospective study

on Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in children with diarrhea in Parana State, Brazil. *Letters in Applied Microbiology*, 48, 645–647.

- Delannoy, S.; Beutin, L.; Mariani-Kurkdjian, P.; Fleiss, A.; Bonacorsi, S.; Fach, P. (2017). The *Escherichia coli* serogroup O1 and O2 lipopolysaccharides are encoded by multiple O-antigen gene clusters. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7:1-30.
- Dirección General de Estadísticas y Censos (2014). Material aportado por la Dirección de Desarrollo Cultural y Programas Especiales. Casa de Tierra del Fuego, Antártida e Islas del Atlántico Sur. Sede Buenos Aires.
- Edwards, L.A.; Bajaj-Elliott, M.; Klein, N.J.; Murch, S.H.; Phillips, A.D. (2011). Bacterial-epithelial contact is a key determinant of host innate immune responses to enteropathogenic and enteroaggregative *Escherichia coli*. *PLoS One*, 6 (10): e27030.
- EFSA BIOHAZ Panel; Koutsoumanis, K.; Allende, A.; Alvarez-Ordoñez, A.; Bover-Cid, S.; Chemaly, M.; Davies, R.; De Cesare, A.; Herman, L.; Hilbert, F.; Lindqvist, R.; Nauta, M.; Peixe, L.; Ru, G.; Simmons, M.; Skandamis, P.; Suffredini, E.; Jenkins, C.; Monteiro Pires, S.; Morabito, S; Niskanen, T.; Scheutz, F.; da Silva Felício, M.T; Messens, W.; Bolton, D. (2020). Pathogenicity assessment of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and the public health risk posed by contamination of food with STEC. *EFSA Journal SCIENTIFIC OPINION* doi: 10.2903/j.efsa.2020.5967
- Etcheverría, A.I.; Lucchesi P. M. A.; Krüger A.; Bentancor A. B.; Padola N. (2016) *Escherichia coli* in Animals. En Torres, A. G. (Ed) *Escherichia coli* in the Americas (p 149-72). Springer International Publishing, U.S.A.
- Etcheverría, A.I.; Padola, N.L. (2013) Shiga toxin-producing *Escherichia coli* Factors involved in virulence and cattle colonization. *Virulence*, 4 (5): 366–372.
- Fakh, I.; Thiry, D.; Duprez, J.-N.; Saulmont, M.; Iguchi, A.; Piérard, D.; Jouant, L.; Daube, G.; Ogura, Y.; Hayashi, T.; Taminiau, B.; Mainil, J.G. (2017). Identification of Shiga toxin-producing (STEC) and enteropathogenic (EPEC) *Escherichia coli* in diarrhoeic calves and comparative genomics of O5 bovine and human STEC. *Veterinary Microbiology*, 202: 16–22.
- Famiglietti, A.; Quinteros, M.; Vázquez, M.; Marin, M.; Nicola, F.; Radice, M.; Galas, M.F; Pasterán, F.G.; Bantar, C.; Casellas, J.M.; Kovensky Pupko, J.; Couto, E; Goldberg, M.; Lopardo, H.; Gutkind, G.; Soloaga, R. (2015). Consenso sobre las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos en *Enterobacteriaceae*. *Revista Argentina de Microbiología*, 37: 57-66.

- Farfán García, A.E.; Arias Guerrero, M.Y.; Zhang, C.; Iqba, J.; Sánchez, N.T.; Malviya, N.; Gómez Duarte, O. (2015). Patotipos diarreagénicos emergentes de *Escherichia coli* en Colombia. INNOVACIENCIA, 3: 1-11.
- Farfán-García, A.E.; Ariza-Rojas, S.C.; Vargas-Cárdenas, F.A.; Vargas-Remolina, L.V. (2016). Virulence mechanisms of enteropathogenic *Escherichia coli*. Revista chilena de Infectología, 33 (4).
- Fernández, D., Irino, K.; Sanz, M.E.; Padola, N.L.; Parma, A.E. (2010). Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from dairy cows in Argentina. Letters in Applied Microbiology, 51 (4): 377-82.
- Fernández, D.; Krüger, A.; Polifroni, R.; Bustamante, A.V.; Sanso, A.M.; Etcheverría, A.I.; Lucchesi, P.M.A.; Parma, A.E.; Padola, N.L. (2013). Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O130:H11 and O178:H19 isolated from dairy cows. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 3:9.
- Fernández, D.; Rodríguez, E.M.; Arroyo, G.H.; Padola, N.L.; Parma, A.E. (2009). Seasonal variation of Shiga toxin-encoding genes (*stx*) and detection of *E. coli* O157 in dairy cattle from Argentina. Journal of Applied Microbiology, 106 (4): 1260-7.
- Frank, C.; Werber, D.; Cramer, J.P.; Askar, M.; Faber, M.; An der Heiden, M., Bernard, H.; Fruth, A.; Prager, R.; Spode, A.; Wadl, M.; Zoufaly, A.; Jordan, S.; Kemper, M.J.; Follin, P.; Müller, L.; King, L.A.; Rosner, B.; Buchholz, U.; Stark, K.; Krause, G.; HUS Investigation Team (2011). Epidemic profile of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 outbreak in Germany. The New England Journal of Medicine 365: 1771–1780.
- Friesema I.; van der Zwaluw, K.; Schuurman, T.; Kooistra-Smid, M.; Franz, E.; van Duynhoven, Y.; van Pelt, W. (2014). Emergence of *Escherichia coli* encoding Shiga toxin 2f in human Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) infections in the Netherlands, January 2008 to December 2011. Euro Surveillance, 19 (17): 26-32.
- Giugno, S. M. ; Bibiloni, N. ; Rahman, R. ; Miliwebsky, E. ; Chinen, I. ; Rivas, M. (2007). Association between uremic hemolytic syndrome and infection by Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana, 41, 27–33.
- Gomes, T.A.T.; González-Pedrajo, B. (2010). Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC). En Torres, A.G. (Ed) Pathogenic *Escherichia coli* in Latin America (pp. 25-47). Bentham Science Publishers, U.S.A.
- Gomes, T.A.T.; Irino, K.; Girão, D.M.; Girão, V.B.C.; Guth, B.E.C.; Vaz, T.M.I.; Moreira, F.C.; Chinarelli, S.H.; and Mônica AM Vieira, M.A.M. (2004). Emerging Enteropathogenic

Escherichia coli Strains?. Emergin Infectious Diseases 10 (10): 1851-55.

- Gomes, T.A.T.; Yamamoto, D.; Vieira, M.A.M.; Hernandes, R.T. (2016). Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli*. En Torres, A.G (Ed) *Escherichia coli* in the Americas. (p 77-98). Springer Int Pub Switzerland.
- Gonzales, L.; Joffre, E.; Rivera, R.; Sjöling, Å.; Svennerholm, A.M., Iñiguez, V. (2013). Prevalence, seasonality and severity of disease caused by pathogenic *Escherichia coli* in children with diarrhoea in Bolivia. *Journal of Medical Microbiology*, 62:1697–1706.
- Gunzburg, S.T.; Tornieporth, N.G.; Riley, L.W. (1995) Identification of enteropathogenic *Escherichia coli* by PCR-based detection of the bundle-forming pilus gene. *Journal of Clinical Microbiololy*, 33: 1375-1377.
- Guth, B.E.C; Prado, V.; Rivas, M. (2010) Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. En Torres, A.G. (Ed) *Pathogenic Escherichia coli* in Latin America (pp. 65-83). Bentham Science Publishers, U.S.A.
- Hernandes, R.T.; Elias, W.P.; Vieira, M.A.M.; Gomes, T.A.T. (2009). An Overview of Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters* 297(2):137-49.
- Holt, J.G.; Krieg, N.R.; Sneath, P.H.A.; Staley, J.T; Williams, S.T. (1993) *Bergey's Manual of determinative Bacteriology*. Novena edición. Group 5 Facultatively Anaerobic Gram-Negative Rods. Subgroup 1 Family *Enterobacteriaceae*, Genus *Escherichia* p 179-180. Williams & Wilkins Publishers.
- INCUCAI-SAN. Instituto Nacional Centro Único Coordinador de Ablación e Implante y Sociedad Argentina de Nefrourología. Registro Argentino de Diálisis Crónica (2006). https://www.incucai.gov.ar/files/docs-incucai/Materiales/informes-estadisticos/08-registro_arg_dialisis_04_05.pdf
- INEI-ANLIS. Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud. Dr. Carlos G. Malbrán. Servicio Antimicrobianos, Laboratorio Nacional de Referencia en Antimicrobianos, Método de Screening "COLISTIN AGAR-SPOT" Versión 2 (2017). <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2017/09/Protocolo-Agar-spot-COL-2017-version2-Agosto2017.pdf>. consultado 09/2019.
- INEI-ANLIS. Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud. Dr. Carlos G. Malbrán. Servicio Fisiopatogenia Departamento de Bacteriología (2018). Manual de Procedimientos *Escherichia coli* productor de toxina Shiga en el marco de la detección de *E. coli* diarreigénico.
- IPIEC. Instituto Provincial de Análisis e Investigación, Estadística y Censos.

<https://ipiec.tierradelfuego.gov.ar/ganaderia-2/> consultado 07/2019.

- Itoh, F.; Ogino, T.; Itoh, F.; Watanabe, H. (1992). Differentiation and detection of pathogenic determinants among diarrheagenic *Escherichia coli* by polymerase chain reaction using mixed primers. Japanese Journal of Clinical Medicine, 50, 343–347.
- Jiménez Pearson, M.A.; Galas, M.; Corso, A.; Hormazábal, J.C.; Duarte Valderrama, C.; Salgado Marcano, N.; Ramón-Pardo, P.; Melano, R.G. Consenso latinoamericano para definir, categorizar y notificar patógenos multirresistentes, con Resistencia extendida o panresistentes. Revista Panamericana Salud Publica 43, 2019.
- Kaper, J.B.; Nataro, J.P.; Mobley, H.L. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. Nature Reviews Microbiology, 2 (2): 123-40.
- Karmali, M.A.; Mascarenhas, M.; Shen, S.; Ziebell, K.; Johnson, S.; Reid-Smith, R.; Isaac-Renton, J.; Clark, C.; Rahn, K.; Kaper, J.B. (2003). Association of Genomic O Island 122 of *Escherichia coli* EDL 933 with Verocytotoxin-Producing *Escherichia coli* Seropathotypes That Are Linked to Epidemic and/or Serious Disease. Journal of Clinical Microbiology 41 (11): 4930-40.
- Lazovski, J.; Corso, A.; Pasteran, F.; Monsalvo, M.; Frenkel, J.; Cornistein, W.; Corral, G.; Nacinovich, F. (2019). Estrategia de control de la resistencia bacteriana a los antimicrobianos en Argentina. Revista Panamericana de Salud Publica 41: e88.
- Leotta, G.; Chinen, I.; Epszteyn, S.; Miliwebsky, E.; Melamed, I.C.; Motter, M.; Ferrer, M.; Marey, E.; Rivas, M. (2005). Validación de una técnica de PCR múltiple para la detección de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga. Revista Argentina de Microbiología, 37: 1-10.
- Levine, M.M.; Robins-Browne, R.M. (2012). Factors that explain excretion of enteric pathogens by persons without diarrhea. Clinical Infectious Diseases, 55 (4): 303–11.
- Llorente, P.; Barnech, L.; Irino, K.; Rumi, M.V.; Bentancor, A. (2014). Characterization of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolated from Ground Beef Collected in Different Socioeconomic Strata Markets in Buenos Aires, Argentina. Biomed Research International 2014: 795104.
- López, O.; Duverne, L.; Chinen, I.; Carbonari, C.; Mazieres, J.; Deza, N.; Baschier, A.; Miliwebski, E.; Ibelli, V.; Shicariol Pinheiro, S.; Rivas, M. (2012). Shedding and characterization non-O157 of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from beef cattle in one feedlot of Argentina. VTEC, 8th International Symposium on Shigatoxin (Verocytotoxin) producing *Escherichia coli* infections. Ámsterdam, mayo 2012.

- Loureiro, I.; Frankel, G.; Adu-Bobie, J.; Dougan, G.; Trabulsi, L.R.*; Carneiro-Sampaio, M.M. (1998). Human colostrum contains IgA antibodies reactive to enteropathogenic *Escherichia coli* virulence-associated proteins: Intimin, BfpA, EspA, and EspB. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 27 (2):166-71.
- Mainil, J. (2013). *Escherichia coli* virulence factors. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 152 (1-2): 2-12.
- Manning, S.D.; Motiwala, A.S.; Springman, A.C.; Qi, W.; Lacher, D.W.; Ouellette, L.M.; Mladonicky, J.M.; Somsel, P.; Rudrik, J.T.; Dietrich, S.E.; Zhang, W.; Swaminathan, B.; Alland, D.; Whittam, T.S. (2008). Variation in virulence among clades of *Escherichia coli* O157:H7 associated with disease outbreaks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 105(12): 4868–4873. Published online doi: 10.1073/pnas.0710834105.
- Marcos, A. (2019) Coordinación de Epidemiología; Dirección de Planificación y Estrategia de Sanidad Animal; Dirección Nacional de Sanidad Animal; Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA). Comunicación personal.
- Martinez, M.B; Taddei, C.R.; Ruiz-Tagle, A.; Trabulsi, L.R.; Girón, J.A. (1999). Antibody response of children with enteropathogenic *Escherichia coli* infection to the bundle-forming pilus and locus of enterocyte effacement– encoded virulence determinants. *The Journal of Infectious Diseases*, 179: 269–74.
- Masana, M.; D´Astek, B.A.; Palladino, P.M.; Galli, L.; del Castillo, L.L.; Carbonari, C.C.; Leotta, G.A.; Vilacoba, E.; Irino, K.; Rivas, M. (2011). Genotypic characterization of non-O157 Shiga toxin–producing *Escherichia coli* in beef abattoirs of Argentina. *Journal of Food Protection*, 74 (12): 2008-17.
- Masana, M.O.; Leotta, G.A.; Del Castillo, L.L.; D´Astek, B.A; Palladino, P.M.; Galli, L. (2010). Prevalence, characterization and genotypic analysis of *Escherichia coli* O157:H7/NM from selected beef exporting abattoirs of Argentina. *Journal of Food Protection*, 73 (4): 649–56.
- Menrath, A.; Wieler, L.H.; Heidemanns, K.; Semmler, T.; Fruth, A.; Kemper, N. (2010). Shiga toxin producing *Escherichia coli*: identification of non-O157:H7-Super-Shedding cows and related risk factors. *Gut Pathogens*, 2 (1): 7.
- Mercado, E.C.; Gioffré, A.; Rodríguez, S.M.; Cataldi, A.; Irino, K.; Elizondo, A.M.; Cipolla, A.L.; Romano, M.I.; Malena, R.; Méndez M.A. (2004a). Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from diarrhoeic calves in Argentina. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 51 (2): 82-88.

- Mercado, E.C.; Rodríguez, S.M.; Elizondo, A.M.; Marcoppido, G.; Parreño, V. (2004b). Isolation of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* from a South American Camelid (*Lama guanicoe*) with Diarrhea. *Journal of Clinical Microbiology*, 42 (10): 4809-4811.
- Miko, A.; Rivas, M.; Bentancor, A.; Delannoy, S.; Fach, P.; Beutin, L. (2014) Emerging types of Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) O178 present in cattle, deer, and humans from Argentina and Germany. *Frontier Cellular Infection Microbiology*, 4: 78.
- Miliwebsky, E.; Baschkier, A.; Deza, N.; Hiriart, Y.; Lauché, C.; Chinen, I.; Rivas, M. (2018). Evaluation of a rapid immunoassay for detecting Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Argentina. VTEC, 10th International Symposium on Shigatoxin (Verocytotoxin) producing *Escherichia coli* infections. Florencia, Italia, mayo 2018.
- Montero, D.A.; Del Canto, F.; Velasco, J.; Colello, R.; Padola, N.L.; Salazar, J.C.; San Martín, C.; Oñate, A.; Blanco, J.; Rasko, D.A.; Contreras, C.; Puente, J.L.; Scheutz, F.; Franz, E.; Vidal, R.M. (2019). Cumulative acquisition of pathogenicity islands has shaped virulence potential and contributed to the emergence of LEE-negative Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains. *Emerging Microbes and Infections*, 8 (1): 486–502.
- Montero, D.A.; Velasco, J.; Del Canto, F.; Puente, J.L.; Padola, N.L.; Rasko, D.A.; Farfán, M.; Salazar, J.C.; Vidal, R. (2017). Locus of Adhesion and Autoaggregation (LAA), a pathogenicity island present in emerging Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* strains. *Scientific Reports*, 7 (1): 7011.
- Mosquito, S.; Ruiz, J.; Pons, M.J.; Durand, D.; Barletta, F.; Ochoa, T.J. (2012) Molecular mechanisms of antibiotic resistance in diarrhoeagenic *Escherichia coli* isolated from children. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 40: 544–54.
- Nataro J.P.; Kaper, J.B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Review*, 11 (1): 142-201.
- Newton, H.J.; Sloan, J.; Bulach, D.M.; Seemann, T.; Allison, C.C.; Tauschek, M.; Robins-Browne, R.M.; Paton, J.C.; Whittam, T.S.; Paton, A.W.; Hartland, E.L. (2009). Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* Strains Negative for Locus of Enterocyte Effacement. *Emerging Infectious Diseases* 15(3): 372–380.
- Nguyen, R.N.; Taylor, L.S.; Tauschek, M.; Robins-Browne, R.M. (2006). Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* Infection and Prolonged Diarrhea in Children. *Emerging and Infectious Disease*, 12 (4): 597–603.
- Nyholm, O.; Halkilähti, J.; Wiklund, G.; Okeke, U.; Paulin, L.; Auvinen, P.; Haukka, K.; Siitonen, A. (2015). Comparative genomics and characterization of hybrid shigatoxigenic

and enterotoxigenic *Escherichia coli* (STEC/ETEC) strains. PLOS ONE 10 (8):e0135936.

- Ochoa, T.J.; Barletta, F.; Contreras, C.; Mercado, E. (2008). New insights into the epidemiology of enteropathogenic *Escherichia coli* infection. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 102 (9): 852-6.
- Ochoa, T.J.; Gómez-Duarte, O.G. (2016). Antibiotic Resistance in *Escherichia coli*. En Torres, A.G (Ed) *Escherichia coli* in the Americas (p 301-322). Springer Int Pub Switzerland.
- Organización Mundial de la Salud, Organización Panamericana de la Salud. Peligros biológicos. Inocuidad de Alimentos, Control Sanitario, HACCP. https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=10838:2015-peligros-biologicos&Itemid=41432&lang=es consultado 10/2019.
- Orden, J.A.; Cid, D.; Ruiz-Santa-Quiteria, J.A.; García, S.; Martínez, S.; de la Fuente, R. (2002). Verotoxin- producing *Escherichia coli* (VTEC), enteropathogenic *E. coli* (EPEC) and necrotoxicogenic *E. coli* (NTEC) isolated from healthy cattle in Spain. Journal of Applied Microbiology, 93: 29-35.
- Padola, N.L.; Sanz, M.E.; Blanco, J.E.; Blanco, M.; Blanco, J.; Etcheverría, A.I.; Arroyo, G.H.; Usera M.A.; Parma A.E. (2004). Serotypes and virulence genes of bovine Shigatoxigenic *Escherichia coli* (STEC) isolated from a feedlot in Argentina. Veterinary Microbiology, 100 (1-2): 3-9.
- Parma, A.E.; Sanz, M.E.; Blanco J.E.; Blanco J.; Viñas, M.R.; Blanco, M.; Padola, N.L.; Etcheverría, A.I. (2000) Virulence genotypes and serotypes of verotoxigenic *Escherichia coli* isolated from cattle and foods in Argentina. European Journal of Epidemiology, 16: 757-62.
- Parissi-Crivelli, A.; Parissi-Crivelli, J.M.; Girón, J.A. (2000). Recognition of enteropathogenic *Escherichia coli* virulence determinants by human colostrum and serum antibodies. Journal of Clinical Microbiology, 38 (7): 2696–2700.
- Paton, A.W.; Paton, J.C. (2002). Direct detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by multiplex PCR for *stx1*, *stx2*, *eae*, *ehxA*, and *saa*. Journal of Clinical Microbiology, 40 (1): 271-4.
- Paton, A.W.; Srimanote, P.; Woodrow, M.C.; Paton, J.C. (2001). Characterization of Saa, a novel autoagglutinating adhesin produced by locus of enterocyte effacement-negative Shiga-toxigenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans. Infection and Immunity, 69 (11): 6999–7009.

- Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing (2018) 28th Edition. Weinstein, M.P.; Patel, J.B. Clinical and Laboratory Standards Institut.
- Pestana de Castro, A.F.; Bentancor, A.; Mercado, E.C.; Cataldi, A.; Parma, A.E. (2010). *Escherichia coli* Animal Reservoirs, Transmission Route and Animal Disease. En Torres, A.G. (Ed) Pathogenic *Escherichia coli* in Latin America (pp. 223-248). Bentham Science Publishers, U.S.A.
- Pianciola, L.; Chinen, I.; Mazzeo, M.; Miliwebsky, E.; González, G.; Müller, C.; Carbonari, C.; Navello, M.; Zitta, E.; Rivas, M. (2014). Genotypic characterization of *Escherichia coli* O157:H7 strains that cause diarrhea and hemolytic uremic syndrome in Neuquén, Argentina. International journal of medical microbiology, 304 (3-4): 499–504.
- Piérard, D.; De Greve, H.; Haesebrouck, F.; Mainil, J. (2012). O157:H7 and O104:H4 Vero/Shiga toxin-producing *Escherichia coli* outbreaks: respective role of cattle and humans. Veterinary Research, 43 (1): 13.
- Pizarro, M.A.; Orozco, J.H.; Degarbo, S.M.; Calderón, A.E.; Nardello, A.L.; Laciari, A.; Rüttler, M.E. (2014). Virulence profiles of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* and other potentially diarrheagenic *E.coli* of bovine origin, in Mendoza, Argentina. Brazilian Journal of Microbiology, 44 (4): 1173–1180.
- Qin, X.; Klein, E.J.; Galanakis, E.; Thomas, A.A.; Stapp, J.R.; Rich, S.; Buccat, A.M.; Tarr, P.I. (2015). Real-Time PCR Assay for Detection and Differentiation of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* from Clinical Samples. Journal of clinical microbiology, 53(7), 2148–2153. <https://doi.org/10.1128/JCM.00115-15>
- Qrskov, F.; Orskov, I. (1984) Serotyping of *Escherichia coli*. Methods in Microbiology, 14, 43-112.
- Rasko, D.A.; Webster, D.R.; Sahl, J.W.; Bashir, A.; Boisen, N.; Scheutz, F.; Paxinos, E.E.; Sebra, R.; Chin, C.S.; Iliopoulos, D.; Klammer, A.; Peluso, P.; Lee, L.; Kislyuk, A. O.; Bullard, J.; Kasarskis, A.; Wang, S.; Eid, J.; Rank, D.; Redman, J.C.; Steyert, S.R.; Fridmodt-Moller, J.; Struve, C.; Petersen, A.M.; Krogfelt, K.A.; Nataro, J.P.; Schadt, E.E.; Waldor, M.K. (2011). Origins of the *E. coli* strain causing an outbreak of hemolytic-uremic syndrome in Germany. New England Journal of Medicine, 365: 709-17.
- Rhades, L.C.; Larzábal, M.; Bentancor, A.; Sabio y García, J.; Babineca, F.J.; Cataldi, A.; Amigo, N.; Baldone, V.N.; Urquiza, L.; Delicia, P.J.; Forta, M.C. (2019). A one-year longitudinal study of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 fecal shedding in a beef cattle herd. Research in Veterinary Science, 127: 27-32.

- Ribeiro, L.F.; Barbosa, M.M.C.; Pinto, F.R.; Lavezzo, L.F.; Rossi, G.A.M.; Almeida, H.M.S; Amaral, L.A. (2019) Diarrheagenic *Escherichia coli* in raw milk, wáter and cattle feces in non-technified dairy farms. *Ciência Animal Brasileira*, (20): e-47449.
- 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. (1983). Hemorrhagic Colitis Associated with a Rare *Escherichia coli* Serotype. *The New England Journal of Medicine*, 308: 681-685.
- Rivas, M. (2013). Avances en el Conocimiento de la Epidemiología de STEC. Experiencia en Frigoríficos de Argentina. Primer Simposio Life Technologies en Seguridad de Alimentos, Mayo 2013.
- Rivas, 2016. Jornada de Síndrome Urémico Hemolítico. Epidemiología del Síndrome Urémico Hemolítico en Argentina. Situación actual e innovaciones diagnósticas. Servicio Fisiopatogenia INEI – ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”. Buenos Aires, 19/08/2016. Disponible en https://www.sap.org.ar/uploads/archivos/files_dra-rivas-epidemiologia-del-sindrome-uremico-hemolitico-en-argentina-situacion-actual-e-innovaciones-diagnosticas_1494446234.pdf
- Rivas, M.; Chinen, I.; Guth, B.E.C. (2016). Enterohemorrhagic (Shiga Toxin –Producing) *Escherichia coli*. En Torres, A.G (Ed) *Escherichia coli* in the Americas. (p 97-123). Springer Int Pub Switzerland.
- Rivas, M.; Chinen, I.; Miliwebsky, E.; Masana, M. (2014). Risk Factors for Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*-Associated Human Diseases. *Microbiology Spectrum*, 2, (5).
- Rivero, M.A.; Padola, N.L.; Etcheverria, A.I.; Parma, A.E. (2004). *Escherichia coli* Enterohemorrágica y Síndrome Urémico hemolítico en Argentina. *MEDICINA* 64: 352-356
- Rivas, M.; Padola, N.L.; Lucchesi, P.M.A.; Masana, M. (2010). Diarrheagenic *Escherichia coli* in Argentina. En Torres, A.G. (Ed) *Pathogenic Escherichia coli* in Latin America (pp. 142-161). Bentham Science Publishers, U.S.A.
- Rivero, M.A.; Passucci, J.A.; Rodríguez, E.M.; Parma, A.E. (2010). Role and clinical course of verotoxigenic *Escherichia coli* infections in childhood acute diarrhoea in Argentina. *Journal of Medical Microbiology*, 59: 345–352.
- Rivero, M.A.; Passucci, J.A.; Rodríguez, E.M.; Parma, A.E. (2012). Seasonal variation of HUS occurrence and VTEC infection in children with acute diarrhoea from Argentina. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 31 (6): 1131–35.
- Saldaña, Z.; Erdem, A.L.; Schüller, S.; Okeke, I.N.; Lucas, M.; Sivananthan, A.; Phillips,

- A.D.; Kaper, J.B.; Puente, J.L., Girón, J.A. (2009). The *Escherichia coli* common pilus and the bundle-forming pilus act in concert during the formation of localized adherence by enteropathogenic *E. coli*. *Journal of Bacteriology*, 191 (11): 3451-61.
- Santos, F.F.; Yamamoto, D.; Abe, C.M.; Bryant, J.A.; Hernandez, R.T.; Kitamura, F.C.; Castro, F.S.; Valiatti, T.B.; Piazza, R.M.F.; Elias, W.P.; Henderson, I.R.; Gomes, T.A.T. (2019). The Type III Secretion System (T3SS)-Translocon of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (aEPEC) can mediate adherence. *Frontiers in Microbiology*, 10: 1527.
 - Scaletsky, I.C.A.; Aranda, K.R.S; Souza, T.B; Silva, N.P. (2010). Adherence Factors in Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* Strains Expressing the Localized Adherence-Like Pattern in HEp-2 Cells. *Journal of Clinical Microbiology*, 48 (1): 302–306.
 - Scaletsky, I.C.A.; Fagundes-Neto, U. (2016). Typical Enteropathogenic *Escherichia coli*. En Torres, A.G (Ed) *Escherichia coli* in the Americas. (p 59-76). Springer Int Pub Switzerland.
 - Scaletsky, I.C.; Silva, M.L.; Trabulsi, L.R. (1984). Distinctive Patterns of Adherence of Enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa Cells. *Infection and Immunity* 45(2):534-6.
 - Scheutz, F. (2014). Taxonomy Meets Public Health:The Case of Shiga Toxin Producing *Escherichia coli*. *Microbiology Spectrum* 2(4):EHEC-0019-2013
 - Scheutz, F.; Nielsen, E.M.; Frimodt-Møller, J.; Boisen, N.; Morabito, S.; Tozzoli, R.; Nataro, J.P.; Caprioli, A. (2011). Characteristics of the enteroaggregative Shiga toxin/verotoxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 strain causing the outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, May to June 2011. *Euro Surveillance*, 16 (24).
 - Scheutz, F.; Teel, L.D.; Beutin, L.; Pierard, D.; Buvens, G.; Karch, H.; Mellmann, A.; Caprioli, A.; Tozzoli, R.; Morabito, S.; Strockbine, N.A.; Melton-Celsa, A.R.; Sanchez, M.; Persson, S.; O’Brien, A.D. (2012) Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing Stx nomenclature. *Journal of Clinical Microbiology*, 50: 2951-63.
 - Scheutz, F.; Würzner, R. (2015). VTEC, 9th International Symposium on Shigatoxin (Verocytotoxin) producing *Escherichia coli* infections. Conferencia de cierre. Boston, Estados Unidos, septiembre 2015.
 - Schwidder, M.; Heinisch, L.; Schmidt, H. (2019). Genetics, toxicity, and distribution of enterohemorrhagic *Escherichia coli* hemolysin. *Toxins (Basel)* 11 (9) pii: E502.
 - Singh, P.; Sha, Q.; Lacher, D.W.; Del Valle, J.; Mosci, R.E.; Moore, J.A.; Scribner, K.T.; Manning, S.D. (2015). Characterization of enteropathogenic and Shiga toxin-producing

Escherichia coli in cattle and deer in a shared agroecosystem. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 5: 29.

- Sitio Oficial de Turismo Tierra del Fuego. www.tierradelfuego.org.ar consultado 07/2019.
- Stephan, R.; Zhang, W.; Bielaszewska, M.; Mellmann, A.; Karch, H. (2009). Phenotypic and genotypic traits of Shiga toxin-negative *E. coli* O157:H7/H(-) bovine and porcine strains. *Foodborne Pathogens and Disease* 6(2):235-43.
- Tabaran, F.; Tabaran, A. (2019). Edema disease of swine: a review of the pathogenesis. *Porcine Research* Volume 9 (1)
- Tanaro, J.D.; Galli, L.; Lound, L.H.; Leotta, G.A.; Piaggio, M.C.; Carbonari, C.C.; Irino, K.; Rivas, M. (2012). Non-O157:H7 Shiga Toxin–Producing *Escherichia coli* in Bovine Rectums and Surface Water Streams on a Beef Cattle Farm in Argentina. *Foodborne Pathogens and Disease*, 9, (10): 878-84.
- Tanaro, J.D.; Leotta, G.A.; Lound, L.H.; Galli, L.; Piaggio, M.C.; Carbonari, C.C.; Araujo, S.; Rivas, M. (2010). *Escherichia coli* O157 in bovine feces and surface water streams in a beef cattle farm of Argentina. *Foodborne Pathogens and Disease*, 7 (4): 475-7.
- Tanaro, J.D.; Piaggio, M.C.; Galli, L.; Gasparovic, A.M.; Procura, F.; Molina, D.A.; Vitón, M.; Zolezzi, G.; Rivas, M. (2014). Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in surface water near cattle feedlots. *Foodborne Pathogens and Disease*, 11 (12): 960-5.
- Torres, A.G.; Kanack, K.J.; Tutt, B.; Popov, V.; Kaper, J.B. (2004). Characterization of the second long polar (LP) fimbriae of *Escherichia coli* O157:H7 and distribution of LP fimbriae in other pathogenic *E. coli* strains. *FEMS Microbiology Letters*, 238 (2): 333-344.
- Trabulsi, L.R.; Keller, R.; Gomez, T.A.T. (2002) Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *Emerging and Infectious Disease*, 8, 508-13.
- Tyler, S.D.; Johnson, W.M.; Lior, H.; Wang, G.; Rozee, K.R. (1991). Identification of Verotoxin Type 2 Variant B Subunit Genes in *Escherichia coli* by the Polymerase Chain Reaction and Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis. *Journal of Clinical Microbiology* 29 (7): 1339-43.
- Vanaja, S.K.; Jandhyala, D.M.; Mallick, E.M.; Leong, J.M.; Balasubramanian, S. (2013). Enterohemorrhagic and other Shigatoxin-producing *Escherichia coli*. En *Donnenber, M.S. (Ed), Escherichia coli Pathotypes and Principles of Pathogenesis* (p 121-182). Elsevier Inc. Oxford, UK.
- Vergara, A.F.; Vidal, R.M., Torres, A.G.; Farfan, M.J. (2015). Long polar fimbriae participates in the induction of neutrophils transepithelial migration across intestinal cells

infected with enterohemorrhagic *E. coli* O157:H7. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 4: 185.

- Vidal, M.; Kruger, C.; Duran, R.; Lagos, R.; Levine, M.; Prado, V.; Toro, C.; Vidal, R. (2005). Single PCR assay to identify simultaneously the six categories of diarrheagenic *Escherichia coli* associated with enteric infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 43 (10): 5362–5365.
- Vieira, M.A.; Andrade, J.R.; Trabulsi, L.R.; Rosa, A.C.; Dias, A.M.; Ramos, S.R.; Frankel, G.; Gomes, T.A.T. (2001). Phenotypic and Genotypic Characteristics of *Escherichia coli* Strains of Non-Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) Serogroups That Carry *eae* and Lack the EPEC Adherence Factor and Shiga Toxin DNA Probe Sequences. *Journal of Infectious Diseases* 183(5):762-72.
- Wang, L.; Jokinen, C.C.; Laing, C.R.; Johnson, R.P.; Ziebell, K.; Gannon, V. (2018). Multi-Year Persistence of Verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) in a Closed Canadian Beef Herd: A Cohort Study. *Frontiers in microbiology*, 9, 2040.
- Werber, D., Beutin, L., Pichner, R., Stark, K., and Fruth, A. (2008). Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serogroups in food and patients, Germany. *Emerging and Infectious Disease*, 14: 1803–1806.
- Werber, D.; Scheutz, F. (2019). The importance of integrating genetic strain information for managing cases of Shiga toxin-producing *E. coli* infection. *Epidemiology & Infection* 147: e264.
- Wieler, L. H.; Semmler, T.; Eichhorn, I.; Antao, E. M.; Kinnemann, B.; Geue, L.; Karch, H.; Guenther, S.; Bethe, A. (2011). No evidence of the Shiga toxin-producing *E. coli* O104:H4 outbreak strain or enteroaggregative *E. coli* (EAEC) found in cattle faeces in northern Germany, the hotspot of the 2011 HUS outbreak area. *Gut Pathogens*, 3:17.
- World Health Organization (WHO) (1998) Zoonotic non-O157 Shiga Toxin Producing *Escherichia coli* (STEC): report of a WHO scientific working group meeting. Berlin, Germany. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/68880>. Consultado 03/2019.
- Zhang, S.; Yang, G.; Huang, Y.; Zhang, J.; Cui, L.; Wu, Q. (2018). Prevalence and Characterization of Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* Isolated From Retail Foods in China. *Journal of Food Protection* 81(11):1761-67.