



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**VETERINARIAS**



Trabajo de Tesis realizado como requisito para optar al título de

**DOCTOR EN CIENCIAS VETERINARIAS**

**Prevalencia de *Escherichia coli* enterotoxigénico y *Escherichia coli* productor de toxina Shiga en cerdos sin manifestación clínica de diarrea de la provincia de Buenos Aires**

**AUTOR:** MOREDO, Fabiana Alicia

**DIRECTOR:** LEOTTA, Gerardo Aníbal

**CODIRECTOR:** QUIROGA, María Alejandra

**LUGAR DE TRABAJO:** Laboratorio de Diagnóstico e Investigaciones Bacteriológicas y Laboratorio de Microbiología de los Alimentos, FCV, UNLP

**MIEMBROS DEL JURADO**

LOJO, María Mercedes

PADOLA, Nora Lía

ZIELINSKY, Gustavo

**2012**

A mis amores, Cacho, Alicia, Martín, Tomás y Lola

## **AGRADECIMIENTOS**

El presente trabajo de tesis es la culminación de varios años de trabajo intenso pero muy gratificante, cuyos resultados espero puedan colaborar con los profesionales sanitaristas a cargo de las explotaciones porcinas.

En primer lugar quiero agradecer a mi marido Martín por su presencia incondicional, por su colaboración en varias tareas relacionadas con este trabajo y especialmente por bancar mis ausencias de casa. A mis padres, Cacho y Alicia, por haberme educado e inculcado valores como dedicación, responsabilidad, honestidad y especialmente amor.

Agradezco al Doctor Carlos Perfumo por haber apoyado mi propuesta de trabajo, sin el cuál no lo hubiesemos podido realizar. Al Doctor Néstor Stanchi por haberme autorizado a dedicar parte de mi horario laboral, en el desarrollo de este proyecto, y a la Doctora Gabriela Giacoboni por haberme permitido realizarlo en el Laboratorio de Diagnóstico e Investigaciones Bacteriológicas.

Agradezco a todos mis amigos, colegas y compañeros quienes de alguna manera colaboraron para llevar a cabo este arduo trabajo: Pablo Piñeyro, Walter y Fabio Nievas. Germán Vigo, Gastón Moré, Javier Cappuccio, integrantes del proyecto de incentivos al cuál pertenezco, personal docente y no docente del Laboratorio de Inmunoparasitología y las cátedras de Virología y Animales de Laboratorio. Al Médico Veterinario Santiago Corva por su colaboración en el análisis de datos.

A los Doctores Sanz y Etcheverría por haber realizado la serotipificación de los aislamientos.

A los Doctores Gabriel Gutkin y José Di Conza por habernos permitido utilizar su programa informático para el análisis de los resultados de ERIC-PCR.

A Julio Copes, y en su nombre como profesor titular de la Cátedra de Tecnología de los Alimentos a todo su personal por haber permitido que finalice este trabajo en el Laboratorio de Microbiología de los Alimentos (LaMA). A mi nuevo grupo de trabajo lleno de vitalidad y autenticidad Victoria, Florencia, Virginia, Lucía, Julián, Emanuel y Luciano.

Agradezco la cordialidad y colaboración brindada por los doctores Nora Lía Padola, Gustavo Zielinsky y Mercedes Lojo.

El más especial de los agradecimientos como director y especialmente amigo, a Gerardo por su apoyo incondicional en todos los momentos que nos tocó atravesar. Y a Alejandra, que aceptó sumarse a nuestro proyecto con sus valiosísimos aportes.

Por fin agradezco a las autoridades de la Facultad de Ciencias Veterinarias, por permitirnos a sus docentes generar conocimiento a través de nuestras formaciones de posgrado, con la finalidad de volcarlos a la sociedad, uno de los objetivos principales de las Universidades Públicas.

Eternamente gracias!!!!!!

## CITAS BIBLIOGRÁFICAS CORRESPONDIENTES A LAS PUBLICACIONES

### PARCIALES DEL TRABAJO DE TESIS

**MOREDO F; PIÑEYRO P; QUIROGA MA; LEOTTA G.** Toxigenic *Escherichia coli*, detection in healthy pigs from Buenos Aires Province, Argentina. 7<sup>th</sup> International Symposium on Shiga Toxin (Verocytotoxin) Producing *Escherichia coli* Infections. 10 al 13 de Mayo de 2009, Buenos Aires, Argentina.

**MOREDO F, PIÑEYRO P, CAPPuccio J, PELLEGRINO F, QUIROGA MA, PERFUMO CJ, LEOTTA G.** Detección, caracterización genotípica y sensibilidad antimicrobiana de *Escherichia coli* enterotoxigénico y productor de toxina Shiga aislados de cerdos con infección subclínica. X° Congreso de la Asociación Latinoamericana de Veterinarios Especialistas en Cerdos, X° Congreso Nacional de Producción Porcina, realizado entre los días 8 y 11 de agosto de 2010 en Mendoza. En función de sus aportes al conocimiento, a este trabajo le otorgaron el Primer Premio en el Área Sanidad.

**MOREDO F, PIÑEYRO P, CAPPuccio J, QUIROGA MA, LEOTTA G.** Detección, caracterización genotípica y sensibilidad antimicrobiana de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga y *Escherichia coli* O157 no toxigénicos aislados a partir de cerdos sanos de la Provincia de Buenos Aires. XX Congreso Latinoamericano de Microbiología. IX Encuentro Nacional de Microbiología. 27 al 30 de setiembre de 2010, Montevideo, Uruguay.

**ÍNDICE**

	Página
<b>ÍNDICE</b>	VI
<b>TABLAS</b>	X
<b>FIGURAS</b>	XIII
<b>IMÁGENES</b>	XV
<b>ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS</b>	XVII
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>3</b>
<b>1.1 <i>Escherichia coli</i></b>	<b>3</b>
1.1.1 Composición de la pared celular	4
1.1.2 Membrana externa	5
1.1.3 Estructuras accesorias: flagelos y fimbrias	6
1.1.4 Estructura antigénica	11
1.1.4.1 Antígeno O	11
1.1.4.2 Antígeno K	11
1.1.4.3 Antígeno H	12
1.1.5 Factores de virulencia	13
1.1.6 Patogenicidad	14
1.1.7 <i>Escherichia coli</i> enteropatógeno (EPEC)	15
1.1.8 <i>Escherichia coli</i> enterotoxigénico (ETEC)	24
1.1.8.1 Enterotoxinas producidas por ETEC	25
1.1.8.2 Factores de colonización	37
1.1.9 <i>Escherichia coli</i> enteroagregativo (EAEC)	40
1.1.10 <i>Escherichia coli</i> de adherencia difusa (DAEC)	44

1.1.11	<i>Escherichia coli</i> productor de toxina Shiga (STEC)	46
1.1.12	Aislamiento y Tipificación	54
1.1.12.1	Métodos tradicionales	54
1.1.12.2	Métodos moleculares	55
1.1.13	Subtipificación	55
1.1.13.1	Métodos fenotípicos	55
1.1.13.2	Métodos genotípicos	56
<b>1.2</b>	<b>Diarreas producidas por <i>E. coli</i> en cerdos</b>	<b>59</b>
1.2.1	Diarrea neonatal	59
1.2.2	Diarrea posdestete y enfermedad de los edemas	61
<b>1.3</b>	<b>Enfermedades Transmitidas por Alimentos</b>	<b>65</b>
1.3.1	Situación actual de las ETA causadas por STEC	66
1.3.2	Reservorios y vías de transmisión de STEC	68
1.3.3	El cerdo como reservorio de STEC	71
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS</b>	
2.1	Objetivo general	73
2.2	Objetivos particulares	73
<b>3.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
3.1	Toma de muestra, cultivos primarios y elaboración de ADN molde	75
3.1.1	Toma de muestras	76
3.1.2	Cultivo primario	77
3.1.3	Elaboración del ADN molde	77
3.2	Detección de cerdos portadores de genes de virulencia característicos de ETEC, STEC y <i>Escherichia coli</i> O157	78
3.3	Aislamiento, caracterización feno y genotípica y subtipificación	82

<b>molecular de los aislamientos de <i>Escherichia coli</i> toxigénicos y <i>Escherichia coli</i> O157 no toxigénicos</b>	
3.3.1 Metodología de recuperación de aislamientos de <i>Escherichia coli</i> portadores de genes de virulencia	82
3.3.2 Caracterización fenotípica de los aislamientos de <i>Escherichia coli</i>	88
3.3.2.1 Pruebas fisiológicas y bioquímicas	88
3.3.2.2 Sensibilidad antimicrobiana	89
3.3.2.3 Serotipificación	90
3.3.3 Caracterización genotípica de los aislamientos de <i>Escherichia coli</i>	92
3.3.4 Subtipificación	96
3.3.4.1 Subtipificación fenotípica	96
3.3.4.2 Subtipificación genotípica	96
<b>4. RESULTADOS</b>	
<b>4.1 Prevalencia de ETEC, STEC y <i>Escherichia coli</i> O157 no toxigénicos</b>	99
<b>4.2 Asociación entre la presencia de los distintos genes con los grupos de animales según la edad de vida</b>	105
<b>4.3 Recuperación de STEC, ETEC y <i>Escherichia coli</i> O157 no toxigénicos</b>	107
<b>4.4 Caracterización fenotípica de STEC, ETEC y <i>Escherichia coli</i> O157 no toxigénicos</b>	
4.4.1 Pruebas fisiológicas y bioquímicas	109
4.4.2 Sensibilidad antimicrobiana	110
4.4.3 Serotipificación	121
4.4.4 Caracterización genotípica	123
4.4.4.1 Caracterización genotípica de STEC	123
4.4.4.2 Caracterización genotípica de <i>Escherichia coli</i> O157	124
4.4.4.3 Caracterización genotípica de EAEC	125

4.4.4.4 Caracterización genotípica de ETEC	126
<b>4.4.5 Subtipificación fenotípica</b>	
4.4.5.1 Biotipificación	128
4.4.5.2 Serotipificación	130
<b>4.4.6 Subtipificación molecular</b>	
4.4.6.1 STEC portadores de los genes <i>stx</i> <sub>1</sub> y <i>stx</i> <sub>2</sub>	131
4.4.6.2 STEC portadores del gen <i>stx</i> <sub>2e</sub>	134
4.4.6.3 <i>Escherichia coli</i> serotipo O157 (no ETEC)	137
4.4.6.4 ETEC serotipo O157	140
4.4.6.5 ETEC	144
4.4.6.6 ETEC portadores del gen <i>stx</i> <sub>2e</sub>	151
4.4.6.7 EAEC	154
<b>4.4.7 Poder discriminatorio de las pruebas de subtipificación fenotípicas y genotípicas</b>	157
<b>5. DISCUSIÓN</b>	159
<b>6. CONCLUSIONES</b>	174
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b>	176
<b>8. ANEXO</b>	197

**TABLAS**

	Página
Tabla 1. Principales patotipos de <i>Escherichia coli</i> asociados con diarrea neonatal en lechones	60
Tabla 2. Serogrupos de ETEC frecuentemente asociados a diarrea posdestete en cerdos	63
Tabla 3. Secuencia de oligonucleótidos y tamaños de productos amplificados para la detección de ETEC, STEC y <i>Escherichia coli</i> O157	80
Tabla 4. Secuencia de oligonucleótidos y tamaños de productos amplificados para la caracterización genotípica de ETEC, STEC y <i>Escherichia coli</i> O157	94
Tabla 5. Prevalencia de ETEC, STEC y <i>Escherichia coli</i> O157 no toxigénicos, en cerdos sin manifestación clínica de diarrea	100
Tabla 6. Prevalencia de genes <i>stx</i> <sub>1</sub> , <i>stx</i> <sub>2</sub> , <i>stx</i> <sub>2e</sub> y <i>stx</i> <sub>2e</sub> / <i>rfb</i> <sub>O157</sub> en cerdos sin manifestación clínica de diarrea	102
Tabla 7. Prevalencia de <i>eltA</i> y <i>estI</i> detectados en cerdos sin manifestación clínica de diarrea	103
Tabla 8. Prevalencia de <i>eltA</i> y <i>estI</i> solos o combinados con otros genes, detectados en cerdos sin manifestación clínica de diarrea	104
Tabla 9. Asociación entre la presencia de los distintos genes con los grupos de animales según la edad de vida	106
Tabla 10. Índice de recuperación de cepas ETEC, STEC y <i>Escherichia coli</i> O157 no toxigénicos	107
Tabla 11. Genotipos de <i>Escherichia coli</i> recuperados a partir de cerdos sin manifestación clínica de diarrea provenientes de 11 granjas de producción porcina	108
Tabla 12. Características bioquímicas de STEC, ETEC y <i>Escherichia coli</i> O157 aislados de cerdos sin manifestación clínica de diarrea	112
Tabla 13. Comportamiento de <i>Escherichia coli</i> toxigénicos y <i>Escherichia coli</i> O157 no toxigénicos aislados de cerdos sin manifestación clínica de diarrea frente a diferentes antimicrobianos	113

Tabla 14. Comportamiento de STEC, ETEC y <i>E. coli</i> O157 no toxigénicos aislados de cerdos sin manifestación clínica de diarrea frente a diferentes antimicrobianos	114
Tabla 15. Comportamiento frente a diferentes antimicrobianos de STEC, ETEC y <i>Escherichia coli</i> O157 no toxigénicos aislados de cerdos sin manifestación clínica de diarrea. Discriminación por granja	115
Tabla 16. Fenotipos multirresistente de STEC, ETEC y <i>Escherichia coli</i> O157 no toxigénicos aislados de cerdos sin manifestación clínica de diarrea	116
Tabla 17. Patrones de resistencia antimicrobiana de STEC aislados de cerdos sin manifestación clínica de diarrea	118
Tabla 18. Patrones de resistencia antimicrobiana de <i>Escherichia coli</i> O157 no toxigénicos y EAEC aislados de cerdos sin manifestación clínica de diarrea	119
Tabla 19. Patrones de resistencia antimicrobiana de ETEC aislados de cerdos sin manifestación clínica de diarrea	120
Tabla 20. Serotipos de STEC, ETEC y <i>Escherichia coli</i> O157 no toxigénicos aislados de cerdos sin manifestación clínica de diarrea	122
Tabla 21. Caracterización genotípica y serotipos de <i>Escherichia coli</i> productor de toxina Shiga aislados de cerdos sin manifestación clínica de diarrea	124
Tabla 22. Caracterización genotípica y serotipos de <i>Escherichia coli</i> O157 aislados de cerdos sin manifestación clínica de diarrea	125
Tabla 23. Caracterización genotípica y serotipos de EAEC aislados de cerdos sin manifestación clínica de diarrea	126
Tabla 24. Caracterización genotípica y serotipos de ETEC aislados de cerdos sin manifestación clínica de diarrea	127
Tabla 25. Biotipos de STEC, ETEC y <i>Escherichia coli</i> O157 no toxigénicos aislados de cerdos sin manifestación clínica de diarrea	128
Tabla 26. Biotipos de STEC aislados de cerdos sin manifestación clínica de diarrea	129
Tabla 27. Biotipos de ETEC aislados de cerdos sin manifestación clínica de diarrea	130
Tabla 28. Poder discriminatorio de las pruebas de subtipificación fenotípicas y genotípicas	158

Tabla 29. Reacciones fisiológicas y bioquímicas consideradas para la caracterización fenotípica de <i>Escherichia coli</i>	198
Tabla 30. Puntos de corte utilizados para Enterobacterias según CLSI	199

**FIGURAS**

	Página
Figura 1. Estructura de los monómeros de péptidoglicano	4
Figura 2. Estructura del lipopolisacárido de membrana externa	5
Figura 3. Esquematización del mecanismo de patogenicidad de EPEC y EHEC	22
Figura 4. Esquematización de la estructura de la enterotoxina termolábil (LT)	26
Figura 5. Esquematización del mecanismo de regulación del operón <i>eltAB</i>	28
Figura 6. Esquema de un LPS y los posibles sitios de unión con la subunidad B de LT	30
Figura 7. Esquematización del mecanismo de acción de la toxina termoestable STa	34
Figura 8. Esquematización del mecanismo de patogenicidad de ETEC	39
Figura 9. Esquematización del mecanismo de patogenicidad de EAEC	43
Figura 10. Esquematización del mecanismo de patogenicidad de DAEC	45
Figura 11. Esquematización del mecanismo por el cual producen diarrea <i>Escherichia coli</i> STb/AIDA-I	64
Figura 12. ETAPA 1: Procesamiento de las muestras	78
Figura 13. ETAPA 2: Detección de cerdos portadores de genes de virulencia	81
Figura 14a. ETAPA 3: Aislamiento, caracterización fenotípica y genotípica, subtipificación molecular de <i>Escherichia coli</i> toxigénicos y <i>Escherichia coli</i> O157 no toxigénicos	84
Figura 14b. ETAPA 3: Aislamiento, caracterización fenotípica y genotípica, subtipificación molecular de <i>Escherichia coli</i> toxigénicos y <i>Escherichia coli</i> O157 no toxigénicos	85
Figura 14c. ETAPA 3: Aislamiento, caracterización fenotípica y genotípica, subtipificación molecular de <i>Escherichia coli</i> toxigénicos y <i>Escherichia coli</i> O157 no toxigénicos	86
Figura 14d. ETAPA 3: Aislamiento, caracterización fenotípica y genotípica, subtipificación molecular de <i>Escherichia coli</i> toxigénicos y <i>Escherichia coli</i> O157 no	87

toxigénicos

Figura 14e. ETAPA 3: Aislamiento, caracterización fenotípica y genotípica, subtipificación molecular de <i>Escherichia coli</i> toxigénicos y <i>Escherichia coli</i> O157 no toxigénicos	88
Figura 15. Distribución de la prevalencia de cerdos portadores de ETEC, STEC y <i>E. coli</i> O157 en función de la etapa productiva	100
Figura 16. Prevalencia de genes <i>stx</i> <sub>1</sub> , <i>stx</i> <sub>2</sub> y <i>stx</i> <sub>2e</sub> en cerdos sin manifestación clínica de diarrea discriminada según la etapa productiva	102
Figura 17. Prevalencia de genes <i>eltA</i> y <i>estI</i> en cerdos sin manifestación clínica de diarrea discriminada según la etapa productiva	103
Figura 18. Dendograma de STEC aislados de cerdos sin manifestación clínica de diarrea	133
Figura 19. Dendograma de STEC portadores del gen <i>stx</i> <sub>2e</sub> aislados de cerdos sin manifestación clínica de diarrea	136
Figura 20. Dendograma de <i>Escherichia coli</i> O157 aislados de cerdos sin manifestación clínica de diarrea	139
Figura 21. Dendograma de ETEC O157 aislados de cerdos sin manifestación clínica de diarrea	143
Figura 22a. Dendograma de ETEC aislados de cerdos sin manifestación clínica de diarrea	147
Figura 22b. Dendograma de ETEC aislados de cerdos sin manifestación clínica de diarrea	150
Figura 23. Dendograma de ETEC portadores del gen <i>stx</i> <sub>2e</sub> aislados de cerdos sin manifestación clínica de diarrea	153
Figura 24. Dendograma de EAEC aislados de cerdos sin manifestación clínica de diarrea	156

**IMÁGENES**

	Página
Imagen 1. Patrones de adherencia de <i>Escherichia coli</i> enteropatógeno	18
Imagen 2. Lesión de adhesión y barrido ocasionada <i>Escherichia coli</i> enteropatógeno	22
Imagen 3. ETEC adheridos a enterocitos porcinos	25
Imagen 4. Patrón de adherencia agregativa en células HEp-2	42
Imagen 5. Adherencia agregativa que define a EAEC	42
Imagen 6. Adherencia Difusa típica de DAEC	44
Imagen 7. Lesiones de barrido de vellosidades intestinales y formación de pedestal producidas por cepas de EHEC	53
Imagen 8. Ubicación geográfica de las granjas de producción porcina muestreadas	76
Imagen 9. Pruebas fisiológicas y bioquímicas utilizadas para la caracterización fenotípica de <i>Escherichia coli</i>	89
Imagen 10. Pruebas fisiológica y bioquímicas utilizadas para la tipificación de <i>Escherichia coli</i>	110
Imagen 11. Patrones ERIC-PCR de STEC portadores de los genes <i>stx</i> <sub>1</sub> y <i>stx</i> <sub>2</sub> aislados de cerdos sin manifestación clínica de diarrea	131
Imagen 12. Patrones ERIC-PCR de STEC portadores del gen <i>stx</i> <sub>2e</sub> aislados de cerdos sin manifestación clínica de diarrea	134
Imagen 13. Patrones ERIC-PCR de <i>Escherichia coli</i> O157 aislados de cerdos sin manifestación clínica de diarrea	138
Imagen 14. Patrones ERIC-PCR de ETEC O157 aislados de cerdos sin manifestación clínica de diarrea	142
Imagen 15a. Patrones ERIC-PCR de ETEC aislados de cerdos sin manifestación clínica de diarrea	146
Imagen 15b. Patrones ERIC-PCR de ETEC aislados de cerdos sin manifestación clínica de diarrea	148

Imagen 16. Patrones ERIC-PCR de ETEC portadores del gen $stx_{2e}$ aislados de cerdos sin manifestación clínica de diarrea	152
Imagen 17. Patrones ERIC-PCR de EAEC aislados de cerdos sin manifestación clínica de diarrea	155

**ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS**

Ácido desoxirribonucleico	ADN
Ácido etilendiaminotetraacético	EDTA
Ácido N-acetilmurámico	MurNAc
Ácido ribonucleico	ARN
Ácido ribonucleico ribosómico	rRNA
Ácido sulfhídrico	SH <sub>2</sub>
Adenosin di-fosfato	ADP
Adenosin mono-fosfato cíclico	cAMP
Adenosin mono-fosfato	AMP
Adherencia agregativa	AA
Adherencia difusa	DA
Adherencia localizada	LA
Adhesina afimbrial	AFA
Adhesina autoaglutinante de STEC	saa
Adhesina envuelta en la adherencia difusa	AIDA-I
Adhesión y barrido	A/E
Agar Eosina Azul de Metileno	EMB
Agar Trypticase Soya	ATS
Bicarbonato	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
<i>Bundle-forming pilus</i>	BFP
Calcio	Ca <sup>++</sup>
Caldo Trypticase Soya	CTS
Canales cerrados de nucleótidos cíclicos	CNG

Canales reguladores de la conductancia transmembrana fibrosis quística	CFTR
Citotoxina subtilasa	SubAB
Citotoxinas factor necrotizante tipo I	CNF-1
Cloro	Cl <sup>-</sup>
Colonization factor antigens	CFA
Complejo aguja	CA
3-deoxy-D-manosa-ácido octulosónico	Kdo
Desoxirribonucleótido trifosfato	dNTPs
Diarrea pos destete	DPD
<i>E. coli secreted proteins</i>	Esp
Electroforesis en campos pulsados	PFGE
Enfermedad de los edemas	EE
Enfermedades Transmitidos por Alimentos	ETA
<i>Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus PCR</i>	ERIC-PCR
Enterotoxina colérica	CT
<i>EPEC adherence factor</i>	EAF
<i>Escherichia coli</i> de adherencia difusa	DAEC
<i>Escherichia coli</i> enteroagregativo	EAEC
<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágico	EHEC
<i>Escherichia coli</i> enteroinvasivo	EIEC
<i>Escherichia coli</i> enteropatógeno	EPEC
<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénico	ETEC
<i>Escherichia coli</i> productor de citotoxicidad en células Vero	VTEC
<i>Escherichia coli</i> productor de toxina Shiga	STEC
Factor de necrosis tumoral	TNF

Factor porcino asociado a la adhesión-barrido	paa
Fimbrias de adhesión agregativa	AAF
Fosfodiesterasas	PDEs
Fragmentos de restricción de longitud polimórfica	RFLP
Globotriosilceramida	Gb
Grados Celcius	° C
Gran fimbria polar	LPF
Guanilato ciclasa C	GC-C
Guanosin mono-fosfato cíclico	cGTP
Guanosin tri-fosfato	GTP
Inmóviles	NM
Interleuquina	IL
Intervalo de confianza	IC
Islas de patogenicidad	PAIs
Kilo bases	kb
Kilo Dalton	kDa
Lipopolisacáridos	LPS
L-meso-ácido diaminopimélico	DAP
<i>Locus of enterocyte effacement</i>	LEE
Manosa resistente	MR
Manosa sensible	MS
Mayor	>
Mega Dalton	MDa
Menor	<

Microgramo	μg
Microlitro	μl
Micrómetro	μm
Mililitro	ml
Molar	M
Monosialogangliósido G <sub>M1</sub>	G <sub>M1</sub>
<i>Multi-locus Sequence Typing</i>	MLST
N-acetilglucosamina	GlcNAc
Nanómetro	nm
Nicotinamida adenina dinucleótido	NAD
Pares de bases	bp
Pili común de <i>E. coli</i>	ECP
Porcentaje	%
Prostaglandinas E	PGE
Proteína del síndrome de Wiskott-Aldrich	WASP
Proteína quinasa cGMP dependiente	PKG <sub>s</sub>
Proteína quinasa dependiente de cAMP	PKA
Reacción en cadena de la polimerasa	PCR
Receptores proteicos bacterianos para cAMP	CRP
Revoluciones por minuto	rpm
<i>rfb-Restriction Fragment Length Polymorphism</i>	<i>rfb</i> -RFLP
<i>Secretion of E. coli proteins</i>	Sep
Secuencia de inserción	SI
<i>Shigella</i> enterotoxina 1	ShET1

Similar a la adherencia localizada	LAL
Síndrome urémico hemolítico	SUH
Sistema de secreción tipo III	SSTT
Sodio	Na <sup>+</sup>
<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>	SDS
Subunidad alfa de la proteína GTP	G <sub>Sα</sub>
Todo adentro-todo afuera	TA-TF
Toxina codificada en un plásmido	Pet
Toxina Shiga	Stx
Toxina termoestable	ST
Toxina termolábil	LT
Toxina termoestable enteroagregativa	EAST1
<i>Translocated intimin receptor</i>	Tir
Tris-Ácido Acético-EDTA	TAE
Tris-EDTA	TE
Unidades formadoras de colonias	UFC
Vesículas de membrana externa	OMVs
Voltio	V

## Prevalencia de *Escherichia coli* enterotoxigénico y productor de toxina Shiga en cerdos sin manifestación clínica de diarrea de la provincia de Buenos Aires

**Palabras clave:** *Escherichia coli* toxigénicos, STEC, ETEC, cerdos, ERIC-PCR

### **Resumen**

El objetivo del presente trabajo fue determinar la prevalencia de ETEC y STEC aislados de cerdos sin manifestación clínica de diarrea. Entre abril y julio de 2007, se realizó un muestreo transversal en 11 establecimientos de producción porcina. Para la detección y caracterización genotípica de los aislamientos se utilizó PCR en tiempo final. La subtipificación fenotípica se realizó mediante biotipificación y serotipificación. La subtipificación molecular se realizó por la técnica ERIC-PCR. Se detectaron 293 cerdos portadores de al menos un gen característico de STEC, ETEC o *E. coli* O157. El 8,3 % portaron *stx*<sub>1</sub>, *stx*<sub>2</sub> o *stx*<sub>2e</sub>, el 15 % *eltA* o *estI* y el 12,3 % *rff*<sub>O157</sub>. Sobre los 293 animales detectados como portadores de genes de virulencia, se recuperaron 74 (25,2%) aislamientos: 21 STEC (7 portaron *stx*<sub>1</sub>, dos *stx*<sub>2</sub> y 12 *stx*<sub>2e</sub>), 40 ETEC, 10 *E. coli* O157 no toxigénicos y tres EAEC. Los cerdos de la provincia de Buenos Aires sin signología clínica de diarrea son portadores de ETEC, STEC no-O157, *E. coli* O157 no toxigénicos y EAEC. La mayoría de los STEC poseen la variante *stx*<sub>2e</sub>. Los serotipos de STEC no están asociados con diarrea neonatal, diarrea posdestete, enfermedad de los edemas en cerdos o diarrea sanguinolenta ni SUH. Los serotipos de ETEC están asociados con diarrea neonatal, diarrea posdestete o enfermedad de los edemas. Los *E. coli* aislados, presentaron resistencia frente a los antimicrobianos frecuentemente utilizados en las explotaciones porcinas. ERIC-PCR es un método de subtipificación útil para el estudio de ETEC y STEC de origen porcino pero no para el estudio de *E. coli* O157. STEC y ETEC no están epidemiológicamente relacionados. Los resultados obtenidos conforman una base de datos para colaborar con el mejoramiento de la sanidad animal en las piaras de la provincia de Buenos Aires y conocer la portación de STEC patógenos para el ser humano.

Prevalence of Enterotoxigenic *Escherichia coli* and Shiga toxin-producing  
*Escherichia coli* from clinical healthy pigs in Buenos Aires Province

**Key words:** Toxigenic *Escherichia coli*, STEC, ETEC, pigs, ERIC-PCR

**Summary**

The objective of this work was to determine the prevalence of ETEC and STEC isolated from clinical healthy swine. Between April and July of 2007, a cross-sectional study was carried out in 11 farms. For detection and characterization of *E. coli* a final time PCR was applied. For phenotypic characterization, biotyping and serotyping were realized. Molecular genotyping was carrying out using ERIC-PCR method. A total of 293 pigs samples carried at least one gene of STEC, ETEC or *E. coli* O157. 8.3% of pigs carried *stx*<sub>1</sub>, *stx*<sub>2</sub> or *stx*<sub>2e</sub>, 15 % *eltA* or *estI* and 12.3 % *rfb*<sub>O157</sub>. From 293 swine that carried virulence gene, 74 (25.2%) *E. coli* were isolated: 21 STEC (7 with *stx*<sub>1</sub>, 2 with *stx*<sub>2</sub> and 12 *stx*<sub>2e</sub>), 40 ETEC, 10 non toxigenic *E. coli* O157 and 3 EAEC. Clinical healthy pigs from Buenos Aires province carried ETEC, non-O157 STEC, non toxigenic *E. coli* O157 and EAEC. Most of STEC have the *stx*<sub>2e</sub> variant. The serotypes of STEC are not associated with neonatal diarrhea, postweaning diarrhea and edema disease in swines and, bloody diarrhea or SUH in humans. The serotypes of ETEC are associated with neonatal diarrhea, postweaning diarrhea or edema disease. The *E. coli* isolated were resistant to the most frequently used antibiotics. ERIC-PCR is a molecular genotyping useful method to study swine STEC and ETEC but no to study *E. coli* O157. From an epidemiological viewpoint STEC and ETEC are not associated. The results of this study generate a database to improve animal health in Buenos Aires province and allow us to detect carrying pathogenic STEC for human.

## 1. INTRODUCCIÓN

*Escherichia coli* es uno de los principales habitantes del tracto intestinal del hombre y de la mayoría de las especies animales. Se caracteriza por ser un grupo de bacterias genéticamente heterogéneo, cuyos miembros en general son no-patógenos. Sin embargo, una pequeña proporción de este grupo causa importantes enfermedades de distribución mundial, tanto para el hombre como para los animales. Estas cepas potencialmente patógenas se clasifican en categorías en función de los factores de virulencia que presentan y de la manifestación clínica que ellas causan (Fairbrother y Nadeau, 2006; Gyles, 2007).

### 1.1- *Escherichia coli*

*Escherichia coli* pertenece a la familia Enterobacteriaceae, tribu Escherichiae. Morfológicamente se caracteriza por ser un bacilo recto y cilíndrico de 1,1-1,5 por 2-6  $\mu\text{m}$ , que se presenta solo o de a pares. Es gram negativo. Móvil debido a la presencia de flagelos peritricos. Fisiológicamente, *E. coli* es versátil y bien adaptado a sus hábitats característicos. Aerobio y anaerobio facultativo; presenta ambos tipos de metabolismo, respiratorio y fermentativo. *E. coli* puede crecer tanto en presencia como en ausencia de oxígeno. Bajo condiciones anaeróbicas, desarrolla por la vía fermentativa produciendo las clásicas combinaciones de ácidos y gas como productos finales. Sin embargo, también puede desarrollar por la vía anaeróbica, ya que es capaz de utilizar amoníaco, amonio o fumarato como aceptor final de electrones de la cadena respiratoria. Es oxidasa negativo y quimioorganotrófico, ya que puede desarrollar en medios que contienen glucosa como único constituyente orgánico. En general, fermenta la lactosa y no produce  $\text{SH}_2$ ; aunque una escasa cantidad de aislamientos de origen porcino, pueden hacerlo. Se recuperan con facilidad a partir de muestras clínicas sembradas en medios comunes o selectivos (agar MacConkey, agar eosina azul de metileno, etc.) e incubadas a 37° C bajo condiciones aeróbicas (Scheutz y Strockbine, 2005).

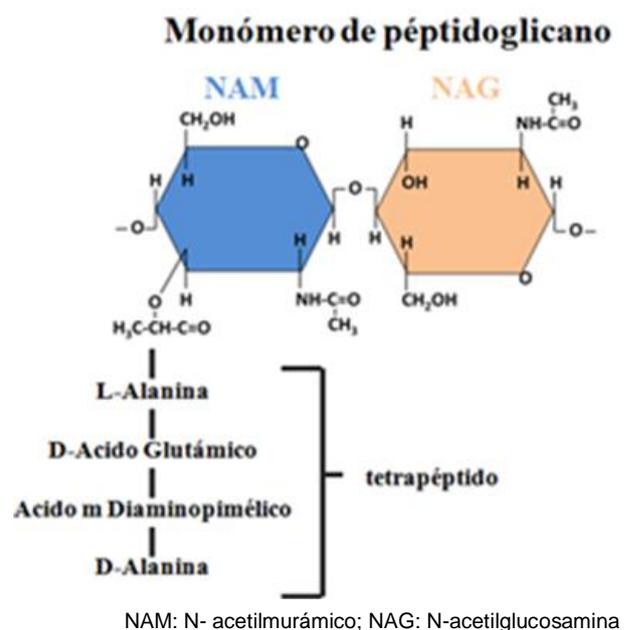
*E. coli*, produce gran cantidad de ácido y gas a partir de la fermentación de los hidratos de carbono (prueba del rojo de metilo positiva) y no utiliza la vía que produce acetil-metil-carbinol (acetoína) (prueba de Voges-Proskauer negativa). Habitualmente, utiliza el acetato de sodio como única fuente de carbono; no ocurre lo mismo con el citrato de sodio (agar citrato de Simmon's, negativo). La mayoría de las cepas decarboxilan la lisina. La excepción incluye a *E. coli* "metabólicamente inactivas" y la mayoría de las *E. coli* enteroinvasivas (EIEC). La mayoría de las cepas producen indol por desdoblamiento del triptófano (Scheutz y Strockbine, 2005).

### 1.1.1 Composición de la pared celular

En las células bacterianas, la pared de peptidoglicanos es la estructura que determina la morfología y protege a la bacteria de la lisis osmótica. En bacterias gram negativas es el sitio de anclaje de la membrana externa (Ruiz, 2008). En los últimos años, se demostró que la morfología celular juega un rol crítico en la regulación de importantes funciones bacterianas como adhesión, movilidad, dispersión, diferenciación polar, depredación y diferenciación celular (Young, 2006).

Los peptidoglicanos son polímeros de glicopéptidos.

Figura 1. Estructura de los monómeros de péptidoglicano



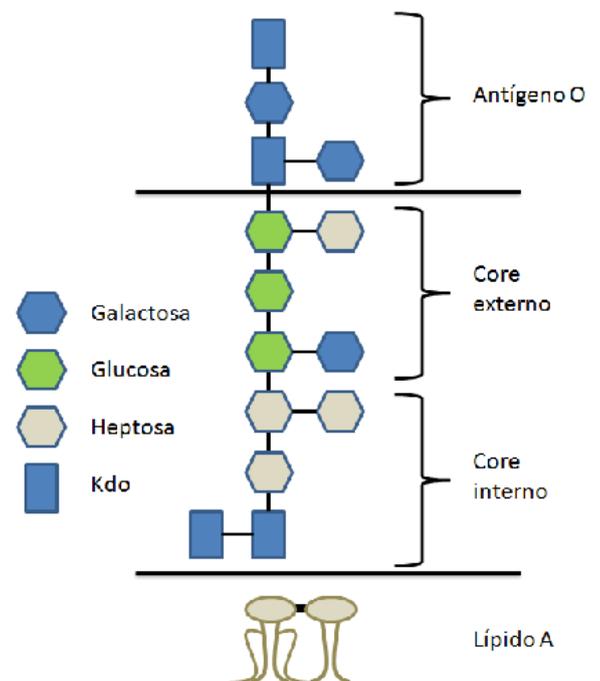
La rigidez estructural de la pared celular está dada por sáculos de mureína (peptidoglicano), los cuales consisten principalmente en una lámina simple monomolecular de mureína, un polímero complejo, compuesto de cantidades iguales de polisacáridos (N-

acetilglucosamina [GlcNAc] y ácido N-acetilmurámico [MurNAc] y péptidos (L-alanina, D-ácido glutámico, L-meso-ácido diaminopimélico [DAP], D-alanina). Cadenas lineales de unidades alternadas de GlcNAc y MurNAc están unidas entre sí por puentes glicosílicos y cadenas cortas de los péptidos anteriormente mencionados, se alternan con isómeros ópticos D y L uniéndose a los azúcares a través de enlaces amida de los grupos carboxilo de cada ácido murámico. Glicanos adyacentes están interconectados a otros péptidos a través de cadenas laterales, formando una molécula gigante que le provee el soporte estructural a la célula (Scheutz y Strockbine, 2005). La síntesis de peptidoglicano comienza en el citoplasma y culmina en el ambiente extracitoplásmico donde ocurre el ensamblaje e interconexión entre los componentes. En *E. coli* la biogénesis comienza con la síntesis de los nucleótido precursores en el citoplasma. Varias son las enzimas que intervienen en este proceso, glicosiltransferasas, transpeptidasas, DD-carboxipeptidasas, fosfatasa, flipasa del lípido II, etc. (Ruiz, 2008) (Figura 1).

### 1.1.2 Membrana

**externa.** La membrana externa de *E. coli* está conformada por más de un millón de moléculas de lipopolisacáridos (LPS), formados por tres dominios covalentemente unidos: 1) lípido A, endotoxina; 2) core, región bisagra, oligosacáridos fosforilados no repetitivos; 3) antígeno O, polímeros de oligosacáridos inmunogénicos repetidos (1 – 40 unidades) (Scheutz y Strockbine, 2005) (Figura 2).

Figura 2. Estructura del lipopolisacárido de membrana externa



### 1.1.3 Estructuras accesorias

**Flagelos.** Los organismos móviles del género, normalmente poseen entre 5 y 10 flagelos por célula, distribuidos al azar alrededor de la superficie (flagelación peritrica). El filamento flagelar mide alrededor de 20 nm de diámetro y puede alcanzar más de 20 µm de longitud. Consiste en subunidades de una única proteína, flagelina, la cuál está codificada en el gen *fliC*. La mayoría de las cepas de *E. coli* tiene sólo un gen el cuál no es sometido a variación de fase (Scheutz y Strockbine, 2005).

**Fimbrias.** La adhesividad a los tejidos hospedadores y a los compuestos circulantes, es una importante característica de *E. coli* la cuál se ve reflejada en el elevado número de tipos de adhesinas y sus altos niveles de expresión sobre la superficie bacteriana. La capacidad de adhesión es un determinante importante en el tropismo de tejidos, en el proceso de colonización bacteriana y ayuda a *E. coli* a resistir los mecanismos de defensa del hospedador. Las fimbrias son largas estructuras filamentosas compuestas por cientos de copias de una subunidad mayor, denominada fimbrilina. *E. coli* puede expresar simultáneamente más de 200 copias del filamento; representando esta acción el mayor gasto de energía. La función primaria de las fimbrias, ejemplo unión a receptores, en la mayoría de los casos está mediada por un componente menor (adhesina) que puede estar localizado en el extremo del filamento y en algunos sitios a lo largo del mismo. Los inconvenientes en definir un tipo de fimbria, proceden principalmente de las variaciones inmunológicas, dentro y a través de las mismas, así como de las variaciones en las secuencias menores de la subunidad adhesina. Mientras que las variaciones serológicas de las fimbrias, están determinadas por la estructura de la subunidad mayor (fimbrilina), una pequeña variación en la secuencia de la subunidad menor (adhesina), puede ocasionar profundos efectos en la adhesión; por lo tanto, la identidad serológica y la función biológica pueden variar independientemente (Westerlund-Wikström y Korhonen, 2005).

Una de las posibles clasificaciones de las fimbrias, se basa en la especificidad por sus receptores, por ejemplo, en la capacidad de adhesión sobre glóbulos rojos en presencia de manosa. Según este método se reconocen dos tipos de fimbrias: manosa-sensibles (MS), incapaces de aglutinar los glóbulos rojos en presencia de D-manosa, y las fimbrias manosa resistentes (MR), capaces de aglutinar las células sanguíneas en presencia del azúcar (Scheutz y Strockbine, 2005).

Las fimbrias MS, incluyen las denominadas tipo 1, que se encuentran en la mayoría de las cepas de *E. coli* y comprenden un grupo de antígenos relacionados. Están expresadas por organismos patógenos así como también por comensales; sin embargo, es difícil establecer su rol en la virulencia. La expresión de las fimbrias tipo 1, está sujeta a una variación de fase, resultado de la inversión de un fragmento de ADN que contiene la región promotora de un gen que codifica la subunidad fimbrial mayor (*fimA*) y está influenciada por el ambiente y las condiciones de crecimiento (Scheutz y Strockbine, 2005).

Las fimbrias MR, son serológicamente diferentes y a menudo, su función como factor de virulencia está asociada a la adherencia, que es especie y órgano-específica. Los genes que codifican la producción de estas proteínas pueden ser cromosómicos o plasmídicos. Cuando se localizan cromosómicamente están agrupados con otros genes de virulencia en regiones denominadas islas de patogenicidad (PAIs). Las fimbrias MR de *E. coli* tienen la capacidad de adaptarse a los receptores específicos de las células epiteliales de ciertos hospedadores primarios, a través de la adquisición horizontal de "gene cassettes" localizados en plásmidos, fagos u otros elementos de ADN móvil, necesarios para la colonización (Scheutz y Strockbine, 2005).

La construcción de las fimbrias requiere el plegamiento coordinado, secreción y montaje ordenado de múltiples subunidades proteicas. En *E. coli* las fimbrias pueden ensamblarse por diversas vías, incluyendo la de las chaperonas (la más frecuente entre cepas patógenas) y la de ensamblaje de pilis tipo IV (Sauer y col., 2000).

En los últimos años, a partir de *E. coli* diarreigénicos de origen humano, se caracterizaron diversas fimbrias MR, como son: a) los factores antigénicos de colonización CFA/I y CFA/II (*colonization factor antigens*); b) el antígeno K88 el cual se presenta en diferentes variantes serológicas de cepas patógenas porcinas; c) el antígeno K99 encontrado en varias cepas de *E. coli* enterotoxigénicas de bovino, porcino y ovinos; d) el antígeno F41, normalmente se presenta asociado con el K99, y también se asocia con cepas enterotoxigénicas de terneros, ovejas y ocasionalmente cerdos; y e) el antígeno 987P fimbrias específicas de cepas porcinas (Scheutz y Strockbine, 2005).

En 1983, Ørskov y Ørskov, introdujeron un nuevo sistema simplificado de nomenclatura, en el cuál las fimbrias son denominadas como antígeno F. De acuerdo con este sistema, las fimbrias tipo 1, CFA/I, CFA/II, K88, K99 y 987P fueron denominadas como F1, F2, F4, F5 y F6 respectivamente (Van den Broeck y col., 2000).

Algunas cepas de *E. coli* presentan adhesinas denominadas afimbriales o no fimbriales, asociadas a una estructura amorfa relacionada con la membrana externa. El primer grupo de genes involucrados con la producción de una adhesina no fimbrial fue el denominado *afa*, que codifica una estructura adhesiva llamada AFA, adhesina afimbrial (Labigne-Rousell y col., 1984). Posteriormente, se describieron adhesinas no fimbriales en la superficie de *E. coli* de varios patotipos, codificadas por diferentes grupos de genes (Le Bouguéneec y Bertin, 1999). La familia *afa* incluye grupos de genes estrechamente relacionados (operones *afa*, *daa*, *dra*), considerándose una excepción, ya que pueden ser expresados por cepas uropatogénicas como diarreigénicas humana y animales. Estos operones comparten una organización genética similar y están relacionados a nivel del ADN. La familia de adhesinas Afa presenta integrantes fimbriales y no fimbriales (Le Bouguéneec, 2005).

Aunque la mayoría de las adhesinas están compuestas por varias subunidades que posteriormente se ensamblan, otras están compuestas por una única proteína de membrana

externa. Estas incluyen adhesinas de la familia autotransporte e íntima y cada una juega roles muy diferentes en la patogénesis bacteriana (Le Bouguéneq, 2005).

El antígeno 43, AIDA-I y TibA, son tres adhesinas de *E. coli* pertenecientes a la subclase de autotransporte bacteriano, denominado sistema de secreción tipo IV. Si lo comparamos con la vía de exportación de las chaperonas, este sistema es completamente distinto (Henderson y Nataro, 2001). Toda la información necesaria para atravesar la membrana y llegar a la superficie bacteriana, está presente en la misma proteína, formada por dos subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ . La subunidad  $\beta$  es un componente de la membrana externa que presumiblemente forma un poro a través del cuál la subunidad  $\alpha$  accede a la superficie donde permanece adherida. La adhesina AIDA-I y la adhesina/invasina TibA originalmente se identificaron en el fenotipo de adherencia difusa en aislamientos diarregénicos humanos y *E. coli* enterotoxigénico respectivamente.

La adhesina de membrana externa de *E. coli* enteropatógeno y enterohemorrágico, se llama íntima e interviene en la adhesión a la célula intestinal hospedadora y en el barrido de la microvellosidad intestinal (fenómeno denominado A/E). Todas las íntimas están constituidas por una cola periplásmica amino terminal y un dominio transmembrana conservado, semejante a una porina, que interactúa con el receptor sobre la superficie celular. El dominio extracelular varía entre los integrantes de la familia íntima. Todas las íntimas estudiadas hasta el momento se adhieren al receptor Tir, una molécula producida por la bacteria e insertada en la membrana de la célula hospedadora blanco a través de un sistema de secreción tipo III. La interacción entre íntima y Tir desencadena la condensación de actina debajo de la bacteria y permite la adhesión al citoesqueleto de la célula hospedadora. También se describió que varios tipos de íntima pueden unirse a receptores proteicos expresados por las células hospedadoras, integrina  $\beta 1$  (igual que la invasina producida por *Y. pestis* y la invasina de *E. coli* AfaD) y nucleolina (proteína involucrada en la proliferación celular) (Sinclair y O'Brien, 2002).

Cualquiera sea el patotipo de *E. coli*, la habilidad para adherirse a las células epiteliales es un factor esencial en el proceso de colonización de las células hospedadoras y en el futuro desarrollo del proceso infeccioso. Esta característica es importante tanto para la colonización del tracto intestinal como urinario. Sin embargo, se demostró que esta característica de adhesión cumple otras funciones importantes en los estadios posteriores del proceso infeccioso; por ejemplo, durante la formación de reservorios bacterianos intracelulares para posteriores ciclos de infección, inducción de la señalización celular e inducción de la respuesta inmune innata. La aclaración de los aspectos moleculares del proceso por el cual *E. coli* se adhiere e ingresa a las células epiteliales podría dar lugar al desarrollo de estrategias efectivas para prevenir la emergencia y recurrencia de la infección (Le Bouguéneq, 2005).

Un factor de adhesión denominado pili común de *E. coli* (ECP), formado por una subunidad pilina de 21 kDa, cuya secuencia de aminoácidos corresponde al producto del gen *yagZ* (renombrado *ecpA*), está presente en el genoma de todas las cepas *E. coli* secuenciadas hasta la fecha, incluyendo al patotipo enterohemorrágico. Se demostró la producción de ECP en el 71,6 % de un total de 169 cepas *ecpA*<sup>+</sup>, representando a patógenos intestinales, extraintestinales y flora normal. Estudios estructurales de alta resolución e inmunofluorescencia, demostraron la presencia de estructuras fibrilares, abundantes y peritricas que emanan desde la superficie bacteriana formando puentes físicos entre las bacterias adheridas a los cultivos de células epiteliales. La producción de ECP es una característica común de *E. coli* que colonizan el intestino y otros tejidos hospedadores. ECP es un pili de *E. coli* enterohemorrágico O157:H7 con potencial rol en la colonización de las células hospedadoras y también puede representar un mecanismo de adherencia de *E. coli* patógenos y comensales (Rendón y col., 2007).

### 1.1.4 Estructura antigénica

**1.1.4.1 Antígeno O.** La determinación del antígeno O está basada en la antigenicidad del lipopolisacárido de membrana externa (LPS); la designación del grupo O va del O1 al O173 (O31, O47, O67, O72, O93, O94 y O122 fueron removidos). Se están investigando seis grupos O adicionales, correspondientes a las cepas STEC y recibirán la designación O176 hasta O181. Muchos de estos antígenos O tiene reacción cruzada con otros antígenos O y puede extenderse a antígenos K dentro de *E. coli*, con otros miembros del género y otras enterobacterias. En tipificaciones moleculares utilizando cebadores por fuera del grupo de genes codificadores de 148 representantes del antígeno O (*rfb*) se observó un fragmento amplificado único para cada grupo O con tamaño entre 1,7 y 2 Kb. La posterior digestión con *MbolI* de los productos PCR amplificados resultó en patrones O reproducibles y claramente identificables, para la gran mayoría de los grupos con variación de bandas para cada patrón de 5 a 25. Los análisis identificaron un total de 147 patrones O y permitieron una subdivisión de 13 grupos O. Sin embargo, dos o más grupos O compartieron el patrón con otros 13 patrones O (Scheutz y Strockbine, 2005).

**1.1.4.2 Antígeno K.** El antígeno K es un polisacárido capsular, que puede ser separado en dos grupos, designados como grupo I y grupo II. Los antígenos del grupo I son polisacáridos capsulares mayores a 100 kDa, sólo se encontraron en cepas de los grupos O8, O9, O20 y O101, y se expresan a 18° C y 37° C. Ciertas porciones del polisacárido capsular de algunos antígenos del grupo I, están adheridos a la región core-lípido A formando una estructura designada como  $K_{LPS}$ , que se comporta como un antígeno O tradicional, antígeno K84, el cuál operacionalmente se definió como un antígeno O y designado O93 (Scheutz y Strockbine, 2005).

Los antígenos del grupo II son polisacáridos capsulares menores a 50 kDa que se encuentran principalmente en cepas de grupo O asociadas a enfermedades

extraintestinales. Los polisacáridos capsulares de la mayoría de los antígenos del grupo II tienen estructura semejante, o muy parecida, al de las bacterias gram positivas. Estos antígenos difieren enormemente en cuanto a su composición y características estructurales por lo cuál deben ser divididos en subgrupos en base a sus componentes ácidos. Entre el 20 y 50 % de las cadenas polisacáridas se encuentran unidas a fosfolípidos. Son temperatura dependiente, por lo tanto sólo se expresan a 37° C (Scheutz y Strockbine, 2005).

Hasta el presente se reconocieron 60 antígenos K (Scheutz y Strockbine, 2005).

**1.1.4.3 Antígeno H.** Los antígenos H o flagelares constituyen el tercer grupo de antígenos serotificables. Se describieron 56 antígenos H (H13 y H22 fueron removidos ya que pertenecen a *Citrobacter freundii* y H50 fue borrado ya que es idéntico al H10). Se observaron reacciones cruzadas entre los antígenos H (Scheutz y Strockbine, 2005). Se describieron dos métodos moleculares tentativos para la diferenciación de los grupos de antígenos flagelares de *E. coli*, uno de ellos se basa en fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP) del gen *fliC*. Si bien se observó una gran variedad de patrones de fragmentos de restricción cuando se estudiaron aislamientos pertenecientes a diferentes grupos H, lo contrario ocurrió cuando se estudiaron cepas pertenecientes a un mismo grupo, lo que sugiere que la secuencia de *fliC* dentro de ciertos grupos H está bastante conservada. RFLP y tipificación de secuencias de múltiples locus (MLST) son dos métodos de tipificación molecular a partir de los cuales se puede realizar un esquema de tipificación de antígeno H rápido, refinado y específico que también pueden contribuir a determinar la relación genética entre los diferentes clones de *E. coli*.

### 1.1.5 Factores de virulencia

*E. coli*, representa uno de los organismos bacterianos más frecuentes y en términos generales, mejor estudiado. La mayoría de las cepas de *E. coli* son no patógenas y residen inofensivamente en el lumen intestinal. Sin embargo, en hospedadores inmunosuprimidos o cuando las barreras gastrointestinales son violadas, estas cepas pueden desencadenar procesos infecciosos. Las infecciones producidas por *E. coli* patogénicos, pueden limitarse a las superficies mucosas o diseminarse a través del organismo. Como consecuencia de esto, se pueden identificar tres síndromes clínicos diferentes: a) infecciones del tracto urinario, b) sepsis/meningitis y c) diarreas. La diversidad patogénica de estas bacterias, en individuos aparentemente sanos, está atribuida a la posesión de una gran variedad de factores de virulencia (Nataro y Kaper, 1998).

Otra clasificación posible, basada principalmente, en la presencia o ausencia de regiones de ADN asociadas con ciertos patotipos, es dividir a *E. coli* en a) no-patógenas o comensales, b) patógenos intestinales y c) patógenos extra-intestinales. En la mayoría de los casos, esta información genética (plásmidos, bacteriófagos e islas genómicas), se adquirió horizontalmente y pertenecen al genoma flexible de la bacteria. Estas regiones genómicas contribuyen a la rápida evolución de las variantes de *E. coli* y frecuentemente, son objeto de reagrupamiento, escisión y transferencia así como de futura adquisición de ADN adicional que contribuye a la creación de nuevas variantes patogénicas (Dobrindt, 2005).

Se considera que el genoma de *E. coli* está compuesto por una región conservada de genes *core*, que proveen el esqueleto de la información genética requerida para los procesos celulares esenciales, y un conjunto de genes flexibles no comunes a todas las cepas, que consiste en una característica individual de información genética cepa-específica, la cuál le provee propiedades especiales para adaptarse a condiciones ambientales determinadas. Por lo tanto, las diferencias en el tamaño del genoma reflejan las

variaciones que ocurren en el conjunto de genes flexibles y se deben principalmente a la adquisición o pérdida de ADN genómico. Otro constituyente de esta zona es el grupo de elementos genéticos accesorios móviles: plásmidos, transposones, secuencias de inserción, profagos e islas genómicas. Éstos se pueden integrar al cromosoma o pueden replicarse independientemente como elementos extra-cromosomales. Varios tipos de estos elementos se transfieren horizontalmente y probablemente, estén presentes en la mayoría de los grupos bacterianos filogenéticos, contribuyendo a la variabilidad de contenido genómico inter/intra-especie (Dobrindt, 2005).

### 1.1.6 Patogenicidad

Como otros patógenos localizados en mucosas, *E. coli* debe seguir la siguiente estrategia de infección: a) colonización de la mucosa, b) evasión de los mecanismos de defensa del hospedador, c) multiplicación y d) daño en el hospedador. Una de las características más conservadas de *E. coli* diarreigénicos, es su habilidad para colonizar la mucosa de la superficie intestinal a pesar del peristaltismo y la competencia nutricional con la flora nativa del intestino, incluyendo otras cepas de *E. coli* (Nataro y Kaper, 1998).

Las cepas de *E. coli* aisladas de enfermedades intestinales, se agrupan principalmente en seis categorías diferentes basadas en las evidencias epidemiológicas, características fenotípicas, características clínicas de la enfermedad ocasionada y factores de virulencia específicos. Actualmente, las categorías reconocidas son: enteropatógeno (EPEC), enterotoxigénico (ETEC), enteroinvasivo (EIEC), enteroagregativo (EAEC), de adherencia difusa (DAEC) y productor de toxina Shiga (STEC), los cuales también pueden ser denominados como productores de citotoxicidad en células Vero (VTEC). Estas categorías serán analizadas a continuación, poniendo énfasis en sus factores de virulencia (Scheutz y Strockbine, 2005). La denominación *E. coli* enterohemorrágico (EHEC), hace referencia a cepas que tienen asociadas las mismas características clínicas y patogénicas que el organismo prototipo O157:H7. En la práctica, EHEC se utiliza para describir a un

subgrupo de STEC/VTEC causantes de colitis hemorrágica (Scheutz y Strockbine, 2005). En contraposición, según la Organización Mundial de la Salud, en la categoría de EHEC se incluye el subgrupo de STEC que produce enteritis hemorrágica en el ser humano. Además, los serotipos de EHEC están asociados a enfermedades severas en el hombre (síndrome urémico hemolítico SUH, púrpura trombótica trombocitopénica y ocasionalmente, lesiones en el sistema nervioso central). El serotipo O157:H7 es el prototipo de más de 150 serotipos de STEC que comparten el mismo potencial patogénico. Actualmente se considera STEC como sinónimo de EHEC.

Una vez establecida la colonización, las estrategias patogénicas de las cepas de *E. coli* diarreigénicas exhiben una marcada variedad. Se describieron tres paradigmas generales a través de los cuales se produce la diarrea: a) producción de enterotoxinas (ETEC y EAEC), b) invasión (EIEC), y c) íntima adherencia a membranas (EPEC y EHEC). Sin embargo, la interacción entre el microorganismo y la mucosa intestinal es específica para cada categoría (Nataro y Kaper, 1998).

### **1.1.7 *Escherichia coli* enteropatógeno (EPEC)**

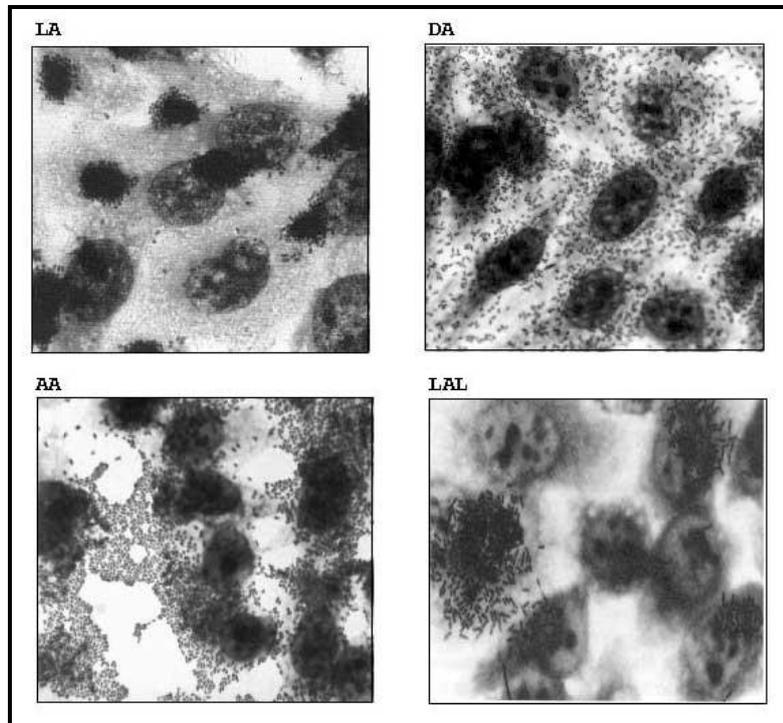
*Escherichia coli* enteropatógeno fue el primer patotipo en describirse y es tal vez, uno de los microorganismos más estudiado. A mediados de la década de los cuarenta, se identificaron en Inglaterra brotes de diarrea en niños de guarderías asociados a *E. coli*. Las bacterias se llamaron enteropatógenas (EPEC) para diferenciar a este tipo virulento de la flora normal (Vidal y col., 2007). Desde 1995, este término se utiliza para definir cepas que producen un daño histológico característico en las células epiteliales conocido como “efecto de adhesión y barrido” (*attaching and effacing*, A/E) y no producen toxinas Shiga (Scheutz y Strockbine, 2005).

EPEC, se describen como típico y atípico en función de su dotación de factores de virulencia. En general, EPEC típicos son más homogéneos en cuanto a sus características de virulencia con respecto a los atípicos (Trabulsi y col., 2002). EPEC típico posee un gran plásmido de virulencia de 70 – 100 Kb denominado EAF (EPEC *adherence factor*), que codifica un pili tipo V llamado pili en “forma de ramillete” (*bundle-forming pilus*) (BFP) que media la adherencia entre las bacterias o la adherencia con las células epiteliales. El plásmido EAF también contiene el locus *per* (regulador codificado en un plásmido), cuyo producto regula al operón *bfp* y *Ler* (regulador codificado en LEE) (*locus of enterocyte effacement*). EPEC atípico, contiene la isla de patogenicidad LEE pero el plásmido EAF está ausente (Bolton y col., 2006). Frecuentemente, estas cepas producen una toxina termoestable enteroagregativa (EAST1) y otros potenciales factores de virulencia no codificados en LEE (Trabulsi y col., 2002). En LEE se encuentran los genes *eae*, *tir*, *esp*, y *sep*. El gen *eae* (*attaching and effacing*) codifica una proteína de membrana externa de 94-kDa llamada intimina que es responsable de la íntima adherencia entre la bacteria y la membrana del enterocito (Trabulsi y col., 2002). Se describieron 19 variantes de *eae* ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\beta 1$ ,  $\alpha 1/\beta 2B$ ,  $\delta/\kappa/\beta 2O$ ,  $\gamma 1/\theta/\gamma 2$ ,  $\alpha 1$ ,  $R/\alpha 2$ ,  $\zeta$ ,  $\eta 1$ ,  $\eta 2$ ,  $\tau 1\mu R/\tau 2$ ,  $\lambda$ ,  $\mu\beta$ ,  $\sigma\beta$ ,  $\xi\beta$ ,  $\omicron$ ) las cuales codifican diferentes tipos y subtipos de intimina. Estas variaciones pueden dar lugar a la especificidad por los diferentes tejidos hospedadores y son utilizadas para la subtipificación de cepas EPEC y STEC (Bolton, 2011). El gen *tir* (*translocated intimin receptor*) codifica el receptor celular Tir al que se une la intimina. Los genes *esp* (*E. coli secreted proteins*) codifican las proteínas EspA, EspB y EspD involucradas en la producción de la lesión A/E. El gen *sep* (*secretion of E. coli proteins*) codifica las proteínas involucradas en el sistema de secreción tipo III, mediante el cual las proteínas Esp y el receptor Tir son transportados al interior del enterocito (Trabulsi y col., 2002).

Retomando las diferencias entre EPEC típico y atípico se encuentran los patrones de adherencia. Las cepas típicas sólo muestran el patrón de adherencia localizada (LA),

mientras que las cepas atípicas pueden presentar los patrones de adherencia difusa (DA), similar a la adherencia localizada (LAL) y la adherencia agregativa (AA). El patrón LAL es producido por cepas de la mayoría de los serotipos y está principalmente mediado por la intimina. El patrón DA está mediado por la adhesina Afa y la AA está mediada por una adhesina agregativa (Trabulsi y col., 2002) (Imagen 1). EPEC atípicos podrían ser menos virulentos que los típicos. Una razón posible sería la pérdida del plásmido EAF, aunque la presencia de otros factores de virulencia podría compensar la pérdida del plásmido. Los serotipos de EPEC típico no se aislaron a partir de muestras de origen animal, sugiriendo que los humanos son el único reservorio para este microorganismo. En contraposición, la mayoría de los serotipos de EPEC atípico se aislaron de diferentes especies animales como bovinos, cerdos, perros y conejos (Hongyan y col., 2000; Trabulsi y col, 2002; Bolton y col., 2006).

### Imagen 1. Patrones de adherencia de *Escherichia coli* enteropatógeno



Adherencia localizada (LA), adherencia difusa (DA), adherencia agregativa (AA), similar a la adherencia localizada (LAL). Aumento X100. (www.CDC.gov)

La lesión A/E se lleva cabo mediante un complejo mecanismo de virulencia, que induce la degeneración de las microvellosidades y altera la morfología normal de la región apical del enterocito. Para fines prácticos, el modelo de patogénesis de EPEC se divide en tres fases: a) adherencia inicial localizada, b) inyección de factores y transducción de señales y c) contacto íntimo y formación de pedestales (Nataro y Kaper, 1998; Vidal y col., 2007).

- a) Adherencia inicial y localizada. La adherencia es un proceso fundamental en la patogénesis y en ella pueden distinguirse dos fases: la primera implica la adherencia inicial entre las mismas bacterias, mientras que la segunda supone la adherencia de las bacterias al enterocito hospedador. Esta acción está directamente relacionada con las fimbrias BFP y el flagelo. La expresión de BFP se induce *in vitro* en la fase de

crecimiento logarítmico y lo regulan factores fisicoquímicos como la temperatura, el calcio y los iones amonio. BFP permiten que las bacterias se agrupen entre ellas formando microcolonias; estos sucesos promueven la adherencia localizada típica de EPEC en cultivo de células *in vitro* y en el intestino delgado. El contacto entre las bacterias y la célula hospedadora se relaciona directamente con el flagelo de EPEC. También están involucrados otros factores como la intimina o los filamentos cortos de EspA (Vidal y col., 2007).

- b) Inyección de factores y transducción de señales. Una vez que la bacteria está adherida, inyecta a la célula una serie de proteínas mediante un sistema de secreción tipo III (SSTT). La mayor parte de estas proteínas están codificadas en LEE. Las proteínas del SSTT forman un complejo aguja (CA) que atraviesa la membrana interna, el espacio periplásmico y la membrana externa de la bacteria y permite la secreción de proteínas. El SSTT de EPEC se ensambla de manera coordinada al menos con 19 proteínas; la plataforma del CA se inicia con la localización de la proteína EscV en la membrana interna y EscC en la membrana externa. Posteriormente, se agregan otros componentes de membrana interna (EscR, EscS, EscT y EscU) que completan la plataforma del CA. La proteína EscN se agrega como el componente citosólico del SSTT; ésta funciona como una ATP-asa citoplasmática para proveer la energía necesaria al sistema. La lipoproteína EscJ conecta la plataforma en la membrana interna, con la proteína EscC en la membrana externa y forma un conducto cilíndrico que atraviesa el espacio periplásmico, a través del cual pasa la proteína EscF para establecerse finalmente como la punta del CA. Este complejo le permite a EPEC secretar proteínas hacia el espacio extracelular (Vidal y col., 2007).

A través del CA pasan tres proteínas codificadas en LEE, conocidas como proteínas translocadoras. La primera de ellas, EspA, se ensambla directamente con

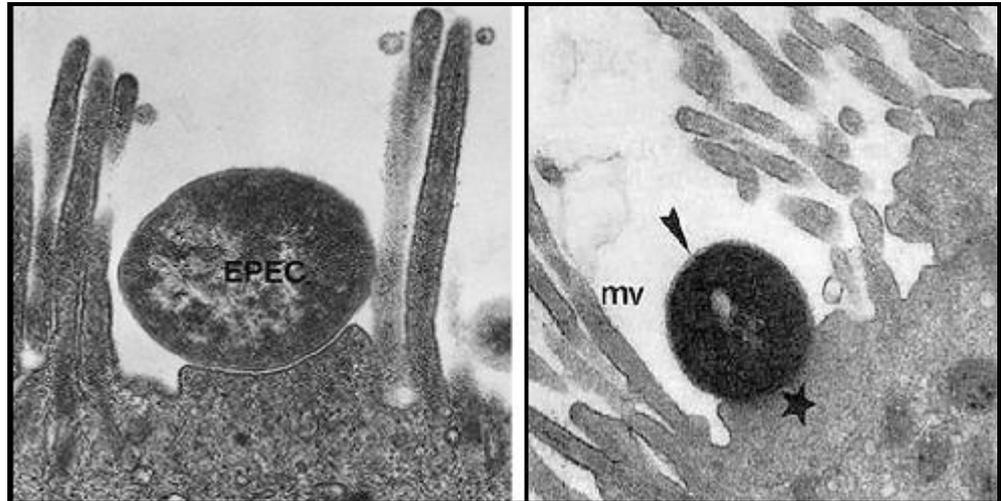
EscF y se polimeriza en la región distal del CA. La polimerización permite que la aguja molecular se extienda y forme un puente físico, que posibilita el contacto entre la bacteria y la membrana de la célula. Evidencias ultraestructurales demostraron que EspA forma un conducto cilíndrico en cuyo interior pasan las proteínas EspB y EspD. Estas proteínas se encuentran en la membrana de la célula eucariota y completan el conducto llamado SSTT-translocón, que conecta y permite la comunicación molecular entre la bacteria y el enterocito, a través del cual EPEC inyecta directamente las proteínas efectoras de la virulencia. Estas últimas se clasificaron en proteínas codificadas en LEE (EspF, EspG, EspH, EspZ, Map y Tir) y no codificadas en LEE (Cif, EspG2, NleC y NleD). EspF redistribuye proteínas importantes de las uniones intercelulares estrechas, con lo que se atenúa la resistencia transepitelial. EspG y EspG2 degradan la red de microtúbulos por debajo de donde se encuentra la bacteria adherida a la célula. Por su parte, EspH modula la estructura del citoesqueleto de actina, así como la formación de filopodios durante la lesión A/E. La proteína EspZ se acumula en zonas donde se producen los pedestales de actina; Map se ubica con proteínas de las mitocondrias, en donde altera el potencial de membrana y propicia la liberación del citocromo C, induciendo la apoptosis (Vidal y col., 2007).

Entre estos factores, la inyección de Tir en el citosol es un paso crucial durante la lesión A/E y la formación de los pedestales. El transporte de Tir a través del SSTT-translocón se lleva a cabo mediante una chaperona específica llamada CesT. Una vez en el citosol, un fragmento central de Tir (dominio hidrofóbico) se inserta dentro de la membrana plasmática de la célula, con lo que expone hacia el espacio extracelular un fragmento de 107 aminoácidos conocido como TIBA (área de unión a intimina), el cual se une a la proteína de membrana externa de EPEC, intimina (Vidal y col., 2007).

- c) Contacto íntimo y formación de pedestales. La última etapa se caracteriza por la unión estrecha entre la bacteria y la célula huésped, y la formación de los pedestales de actina. Tras la unión, Tir-intimina se fosforila por una proteína conocida como c-Fyn. La forma fosforilada de Tir recluta a la proteína adaptadora Nck, la cual atrae, interacciona y activa a otras proteínas reguladoras del citoesqueleto, como WASP (proteína del síndrome de Wiskott-Aldrich) y al complejo Arp2/3. Todas estas proteínas activadas ocasionan la polimerización de actina hacia la zona donde está Tir fosforilada, lo que inicia la reorganización del citoesqueleto. Los pedestales se forman por debajo de donde la bacteria está adherida y se componen sobre todo de actina polimerizada y otras proteínas relacionadas con actina, actina $\alpha$ , fimbria, miosina, talina y ezrina. La reorganización del citoesqueleto altera la morfología y fisiología normal de la región apical de las células, lo que lleva al final, a la pérdida de las microvellosidades intestinales y su función (Vidal y col., 2007).

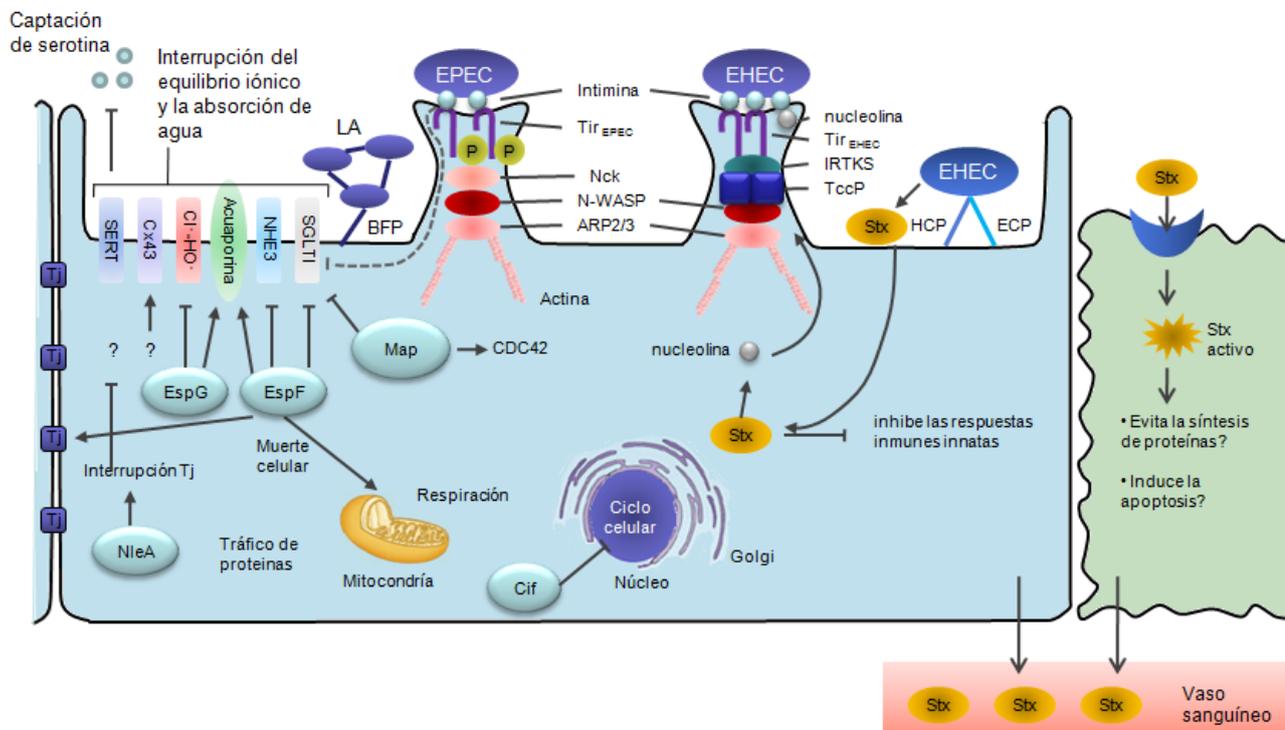
La unión de EPEC al enterocito produce un desequilibrio electrolítico, permitiendo el ingreso de iones positivos ( $\text{Na}^+$ ) y salida de iones negativos ( $\text{Cl}^-$ ). La secreción de iones cloruros puede activar la diarrea acuosa. Asimismo, la destrucción de las microvellosidades ocasiona una disminución de la absorción a nivel del intestino delgado lo que permite explicar la gran persistencia de este cuadro diarreico.

**Imagen 2. Lesión de adhesión y barrido ocasionada *Escherichia coli* enteropatógeno**



EPEC: *E. coli* enteropatógeno. mv: barrido de la microvellosidad; estrella: formación del pedestal; flecha: EPEC adherida. (<http://www.ppdictionary.com>)

**Figura 3. Esquematación del mecanismo de patogenicidad de EPEC y EHEC**



EPEC y EHEC son patógenos productores de una lesión denominada adherencia y barrido (A/E) la cual consiste en el barrido de la vellosidad intestinal y la formación de un pedestal de actina en la

célula hospedadora, inmediatamente por debajo de donde se adhirió la bacteria. Las proteínas efectoras secretadas a través del sistema de secreción tipo III (TTSS), pueden afectar la actividad de intercambio de iones ( $\text{Cl}^- - \text{OH}^-$  y  $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ ), inhibir el sistema de cotransporte 1 sodio-D-glucosa (SGLT1), alterar las porinas del agua. EPEC se adhiere al intestino delgado a través de la proteína BFP, produciendo un patrón característico denominado “adherencia localizada”. La estrecha adhesión está mediada por la interacción entre la intimina y el receptor Tir (receptor transportado de intimina). Tir es fosforilado por una tirosina quinasa de la célula hospedadora. La tirosina fosforilada, recluta Nck, quien activa a la proteína del síndrome neural de Wiskott-Aldrich (N-WASP) y al complejo de proteínas 2/3 relacionadas con la actina (ARP2/3), produciendo el reagrupamiento de actina y la formación del pedestal. A través del TTSS codificado en LEE, se introducen una gran cantidad de proteínas efectoras dentro del enterocito, alterando sus vías metabólicas. El mecanismo por el cual se forma el pedestal en EHEC es ligeramente distinto a EPEC. Tir no se fosforila y la formación del pedestal es Nck independiente. La reorganización de actina está mediada por una proteína denominada *Tir cytoskeleton-coupling protein* (TccP o EspF<sub>U</sub>), la cual vincula a Tir con una proteína receptora de insulina llamada sustrato para la tirosina quinasa (IRTKS o BAIAP2L1) e interactúa con N-WASP para activar al complejo ARP2/3. Complementando esta unión íntima, EHEC se adhiere al intestino grueso a través del pili común de *E. coli* (ECP) y del pili de coli hemorrágico (HCP). EHEC también inyecta proteínas efectoras para manipular los procesos de la célula hospedadora. La toxina Shiga se libera como consecuencia del estrés celular, contribuyendo con el desarrollo de la enfermedad. Los receptores para Stx son la globotriaosilceramida (Gb3s), que se encuentran en las células de Panet (Croxen y Finlay, 2010 adaptado por Martín Carriquiriborde).

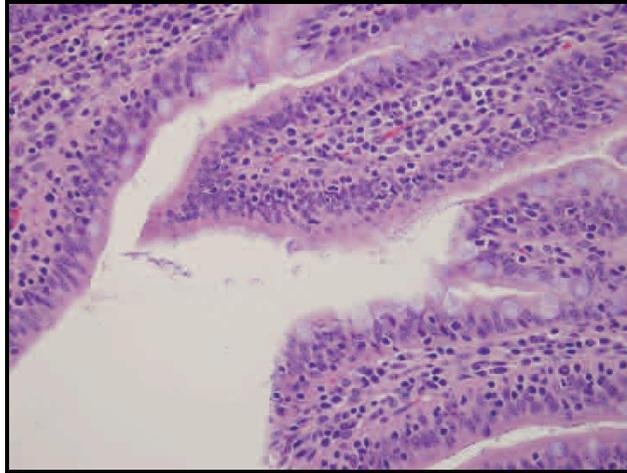
### 1.1.8 *Escherichia coli* enterotoxigénico (ETEC)

Se define como *Escherichia coli* enterotoxigénico (ETEC), aquellas cepas de *E. coli* que al menos elaboran una de las toxinas pertenecientes a los grupos de enterotoxinas denominados termolábil (LT) y termoestable (ST) (Bolton y col., 2006). En principio, ETEC se asociaron a diarreas de lechones que podían ocasionar la muerte de animales neonatos. Los primeros estudios realizados pusieron en evidencia el mecanismo de la enfermedad, incluyendo la existencia de dos plásmidos que codifican la producción de las enterotoxinas. Posteriormente, se observó que también pueden ocasionar diarrea en niños y adultos voluntarios (Nataro y Kaper, 1998).

ETEC es considerado como el prototipo patogénico: las bacterias colonizan la superficie de la mucosa del intestino delgado y posteriormente elaboran una o ambas enterotoxinas sin ocasionar lesión aparente (Imagen 3).

Las cepas ETEC de origen humano están estrechamente relacionadas con los aislamientos provenientes de cerdos con diarrea, compartiendo características patogénicas y factores de virulencia. Sin embargo, ETEC humanos y porcinos muestran una fuerte preferencia de hospedador que se debe a la expresión de fimbrias con distinto tropismo (Fleckenstein y col., 2010).

### Imagen 3. ETEC adheridos a enterocitos porcinos



Acúmulo de ETEC adheridos a los enterocitos de un cerdo de 11 semanas con diarrea acuosa aguda (Tinción H y E; aumento x200)

La gran mayoría de ETEC, presenta plásmidos extracromosomales transportadores de determinantes de virulencia, los cuales proporcionan a las bacterias genes que codifican la producción de toxinas y fimbrias. Estos plásmidos tienen el potencial de movilizarse y crear nuevas cepas enteropatógenas (Johnson y Nolan, 2009).

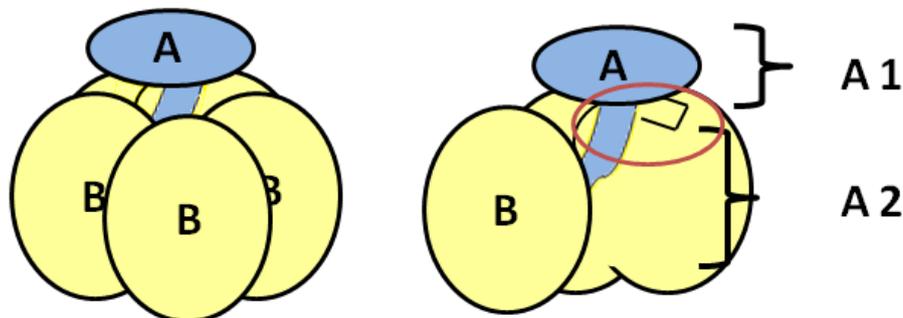
#### 1.1.8.1 Enterotoxinas producidas por ETEC

**Toxina termo-lábil (LT).** LTs de *E. coli* son toxinas oligoméricas estrechamente relacionadas en estructura y función con la enterotoxina colérica (CT) producida por *Vibrio cholerae*. Hay dos grandes serogrupos de LT, LT-I y LT-II los cuales no presentan inmunidad cruzada. LT-I es producida por cepas de *E. coli* patógenas para humanos y animales. LT-II se encontró en aislamientos de origen animal y escasamente en humanos, en ninguno de los dos casos se asoció con procesos infecciosos (Nataro, 1998).

*In vitro*, LT promueve la adherencia de ETEC a los enterocitos; mientras que todos los aislamientos de ETEC tienen el potencial de producir diarrea, aquellos que expresan LT presentan ventajas en términos de colonización (Mudrak y Kuehn, 2010).

**LT-I.** Es una toxina oligomérica de 86 kDa, compuesta por una subunidad A de 28 kDa y cinco subunidades B idénticas de 11,5 kDa. Las subunidades B están agrupadas en forma de anillo y se unen estrechamente al gangliósido  $G_{M1}$  y débilmente al  $G_{D1b}$

Figura 4. Esquematación de la estructura de la enterotoxina temolábil (LT)



y a algunas glicoproteínas intestinales. La subunidad A es la responsable de la actividad

enzimática de la toxina, y está proteolíticamente dividida en los péptidos  $A_1$  y  $A_2$  unidos por puentes disulfuro (figura 4). Se describieron dos variantes de LT-I estrechamente relacionadas, con parcial antigenicidad cruzada. Estas variantes se denominan LT<sub>p</sub> y LT<sub>h</sub> ya que su primer aislamiento fue a partir de porcinos y humanos respectivamente (Nataro, 1998).

- Actividad catalítica de LT. El péptido  $A_1$  tiene actividad ADP-ribosiltransferasa y actúa transfiriendo la mitad de un ADP-ribosil del NAD a la subunidad alfa de la proteína GTP ( $G_{S\alpha}$ ), estimulando la actividad de la adenilato ciclasa. La ADP-ribosilación de la subunidad  $G_{S\alpha}$  produce una activación permanente de la adenilato ciclasa, incrementando los niveles de AMP cíclico intracelular (cAMP). El incremento de estos niveles en la célula hospedadora, abre diferentes canales, incluyendo el receptor

transmembrana fibrosis quística, resultando en la pérdida de fluidos y electrolitos en el lumen intestinal (Mudrak y Kuehn, 2010).

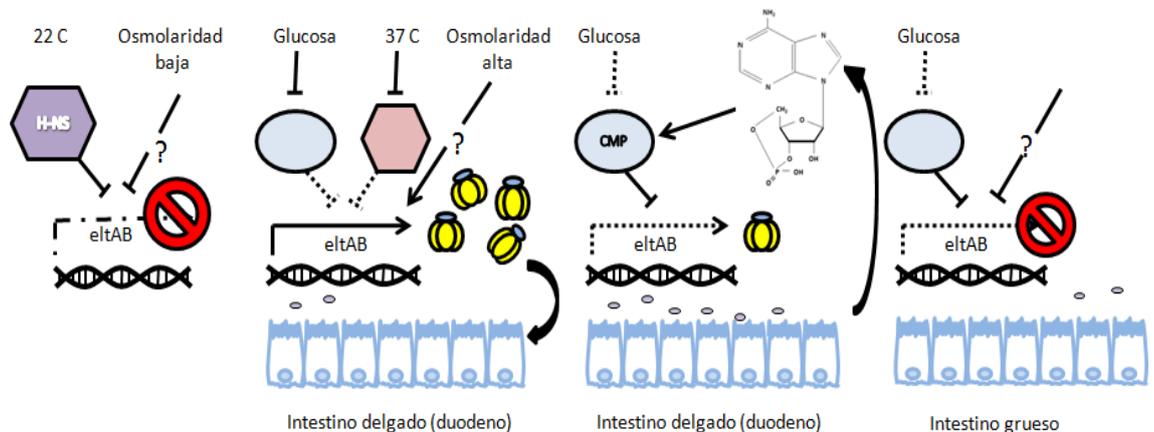
Durante la activación,  $LT_A$  es clivada proteolíticamente liberando un fragmento terminal-C llamado  $A_2$ ; el fragmento polipeptídico  $A_1$  restante, es el responsable de los efectos tóxicos. Sumado a este evento, el puente disulfuro que une las subunidades  $A_1$  y  $A_2$ , también se reduce luego de ingresar a la célula hospedadora, separando completamente los dos fragmentos (Mudrak y Kuehn, 2010).

LT está codificada por un operón compuesto por dos genes, *eltA* ( $LT_A$ ) el cuál se encuentra superpuesto con el comienzo del gen *eltB* ( $LT_B$ ) por cuatro nucleótidos. Estos genes se denominan *eltAB*. En ETEC, *eltAB* se encuentran en un plásmido de virulencia extracromosomal llamado pEnt. Esos genes están flanqueados por una secuencia conservada, seguida por una secuencia de inserción (SI) parcial o intacta. Elementos similares a estos, se hallan frecuentemente próximos a genes que codifican fimbrias de adhesión, sugiriendo un mecanismo general de transferencia de genes asociados con la virulencia. El plásmido pEnt completo puede transferirse a una cepa de *E. coli* no patógena transformándola en toxigénica (Mudrak y Kuehn, 2010).

- Regulación de la producción de LT. Varios son los factores que se encuentra involucrados en la regulación transcripcional del operón *eltAB*, a) Condiciones de crecimiento: el límite de pH en el cuál se produce la toxina es 7,5 - 8. En cuanto a la temperatura se refiere, LT no se produce en cantidades detectables con temperaturas inferiores a 26° C, observando el pico de producción a los 37° C. Un compuesto que induce la liberación de LT es la glucosa. Los niveles de oxígeno y la osmolaridad también están involucrados en la expresión de la toxina. En general, todas estas son condiciones que imitan a las encontradas en el intestino delgado. La presencia de ácidos grasos de cadena corta, perjudica la producción de LT. Estos ácidos se encuentran en cantidades relativamente altas en el colon, estimulando la absorción por una vía independiente al

cAMP. La presencia de esos componentes en el medio podría servirle a la bacteria, como señal de haber llegado al intestino grueso y no tener que producir LT, ya que pasó su sitio blanco, el íleon. b) Regulación a través de un nucleoide asociado a proteína (H-NS): la región conservada *upstream* de *eltA* presenta un promotor de consenso fuerte mientras que la región *downstream* de *eltB* presenta un probable terminador transcripcional, esto indica que los genes son transcritos como un mensaje único. H-NS es responsable de la regulación de LT asociada a la temperatura, pero aún no está claro cuáles son los factores bacterianos capaces de detectar la condición osmótica y la concentración de ácidos grasos

Figura 5. Esquematización del mecanismo de regulación del operón *eltAB*



de cadena corta. c) Retroalimentación de cAMP: el cAMP es un importante regulador de la transcripción de *eltAB*, conjuntamente con los productos finales de la actividad catalítica de LT. Parte del cAMP liberado como consecuencia de la actividad catalítica  $LT_A$ , es vertido en el lumen intestinal. Se definió un circuito de retroalimentación por el cual la producción de LT puede ser desregulada una vez que cierta cantidad de cAMP fue liberado por los enterocitos. Para explicar la relación con la glucosa, se identificaron los receptores proteicos bacterianos para cAMP (CRP) como reguladores negativos de la síntesis de LT. La glucosa

inhibe la producción de cAMP, reduciendo los niveles de CRP activo, de tal modo estimula la producción de LT. Como la glucosa se absorbe en el intestino delgado, es probable que ETEC encuentre elevadas concentraciones de este hidrato de carbono en las primeras porciones del intestino. En consecuencia, la temprana exposición a la glucosa podría inducir la producción de LT, colaborando con el proceso de adherencia en el íleon (ver figura 5). Es interesante mencionar, que la producción de STa es estimulada por CRP, sugiriendo que ETEC, predominantemente, puede producir sólo un tipo de toxina en el momento de la infección (Mudrak y Kuehn, 2010).

- Ensamblaje de la holotoxina.  $LT_A$  y  $LT_B$  tienen secuencias señales que las transportan al espacio periplásmico de *E. coli*, a través del sistema de transporte Sec. Una vez que las subunidades A y B se encuentran en el espacio periplásmico, se ensamblan espontáneamente formando la holotoxina (Mudrak y Kuehn, 2010).

- Secreción. Si bien se consideraba que el espacio periplásmico era el destino final de la toxina LT, Tauschek y col., 2002, identificaron a un operón que codifica un sistema de secreción tipo II funcional, el cual la exporta. Los genes que codifican este aparato también están regulados por H-NS, indicando que se activarían bajo las mismas condiciones que favorecen la producción de LT. Otro sistema de secreción involucrado en la liberación de LT es a través de vesículas de membrana externa (OMVs). Como su nombre lo indica, OMVs son derivados de la membrana externa y en su lumen también están presentes compuestos periplásmicos. En el caso de ETEC, LT activa puede encontrarse tanto dentro de las vesículas como asociada a la superficie (Horstman y Kuehn, 2000; Kuehn y Kesty, 2005).

- Unión con el gangliósido. a) Interacción  $LT/G_{M1}$ : el receptor celular por excelencia para LT es el monosialogangliósido  $G_{M1}$  ( $Gal\beta 3GalNAc\beta 4(NeuAc\alpha 3)Glc\beta 1$ -ceramida). El sitio de unión de la toxina para  $G_{M1}$  está localizado en la interfase entre dos subunidades adyacentes. Sólo es capaz de unirse a  $G_{M1}$  la subunidad B pentamérica. Con

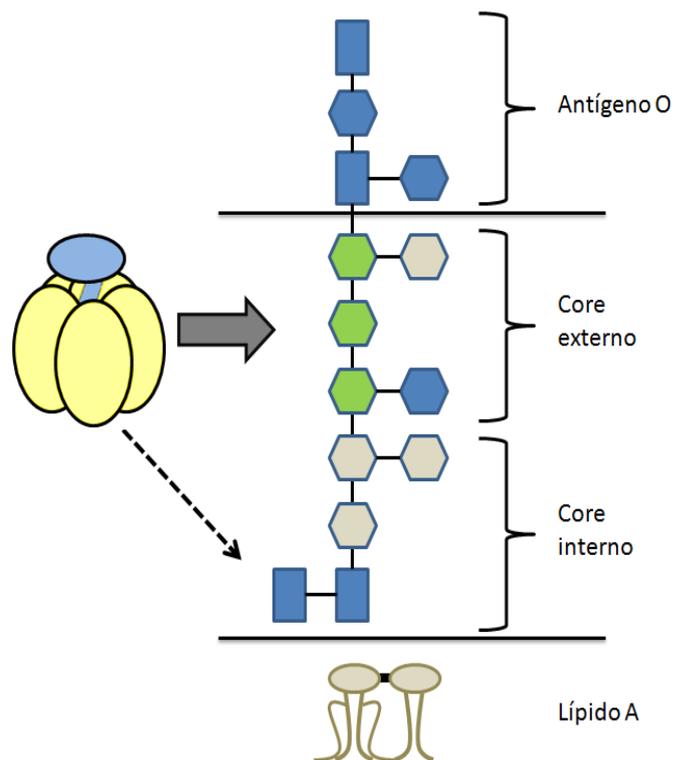
cinco subunidades B, hay cinco sitios de unión disponibles a  $G_{M1}$ . Luego de la unión, LT es internalizada y transportada hacia el retículo endoplásmico. Desde allí,  $LT_A$  es capaz de desplazarse por el citosol, buscando su sitio blanco,  $G_{S\alpha}$ ; b) Sustratos no  $G_{M1}$ :  $LT_B$  puede unirse con gangliósidos adicionales a  $G_{M1}$  ( $G_{D1b}$ , paraglobosido), con muy baja afinidad. Podrían representar un sustrato poco óptimo, el cual permite a LT permanecer cercana a la superficie de los enterocitos hasta tanto localice  $G_{M1}$  y sea internalizada; c) Hidratos de carbono sanguíneos: el efecto tóxico de LT podría no ser específico  $G_{M1}$ , dado que probablemente el glicolípido tipo A del grupo sanguíneo (y posiblemente B) sirvan como receptores funcionales para la toxina tanto *in vivo* como *in vitro* (Mudrak y Kuehn, 2010).

- Unión con

lipopolisacáridos (LPS); a) La unión de LT a la superficie de *E. coli* se debe a una asociación existente con los LPS. Sumada a su habilidad por unirse a gangliósidos e hidratos de carbono sanguíneos, LT se une a los LPS de la superficie de ETEC. Este descubrimiento explica el motivo por el cual se detectaron moléculas de toxinas sobre las OMVs. Esta asociación es independiente de la

presencia de la subunidad A. El sitio de unión entre el LPS y la subunidad B de LT sería en el core central, en la región externa del mismo con una molécula de glucosa y en la región interna con el 3-deoxy-D-manosa-ácido octulosónico (Kdo) (figura 6); b) Posibles roles de la unión LPS/LT: existe una cantidad de posibles funciones para la unión LPS/LT. Una de ellas

Figura 6. Esquema de un LPS y los posibles sitios de unión con la subunidad B de LT



es la modulación de los niveles de toxina. Esta interacción reduce la cantidad de toxina libre que podría ingresar en las células hospedadoras. Sin embargo, esta asociación, genera las vesículas OMVs que transportan moléculas de LT por dentro y fuera de ellas. Dado que LT puede mediar la internalización de vesículas completas, éstas “bombas ricas en toxinas” pueden intoxicar a los enterocitos más rápidamente en un solo evento. Otra función de las OMVs sería proteger a LT de la proteólisis y finalmente una de las más importante sería la de evadir o alterar la respuesta inmune del hospedador (Mudrak y Kuehn, 2010).

Si bien el mecanismo anteriormente expuesto es la explicación clásica de acción de LT y CT, hay evidencias que indican que la respuesta secretoria de estas toxinas es mucho más compleja. Podrían estar involucradas en la serie E de prostaglandinas ( $PGE_1$  y  $PGE_2$ ) o con el sistema nervioso entérico que regula tanto la motilidad intestinal como la secreción de iones (Nataro, 1998).

**LT-II.** El serogrupo LT-II también incrementa los niveles intracelulares de cAMP utilizando mecanismos similares a LT-I. Se diferencia en que LT-II en lugar de utilizar como receptores a  $G_{M1}$ , lo hace con  $G_{D1}$ . Como se mencionó anteriormente, no existen evidencias que relacionen a LT-II con enfermedades de humanos y animales (Nataro, 1998).

**Toxinas termo-estables (ST).** Las enterotoxinas termoestables, son pequeños péptidos secretados por bacterias enterotoxigénicas. Los péptidos termoestables son activos aún luego de exponerlos a  $95^{\circ}C$  durante una hora. Se identificaron dos familias de enterotoxinas termo-estables (STs) que difieren tanto en estructura como en función: STa, soluble con metanol, resistente a las proteasas con sitio de unión en el receptor guanilato ciclasa C y STb, insoluble en metanol y sensible a las proteasas, no tiene como sitio de unión GC-C y actúa incrementando los niveles intracelulares de  $Ca^{++}$  (Weiglmeier y col., 2010). Los genes que codifican ambas clases de toxinas se encuentran principalmente

en plásmidos y en algunos casos, pudieron encontrarse en transposones o en secuencias de inserción. Péptidos con alta homología con STa, también se identificaron en otras bacterias entéricas como *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio cholerae* O1, *Vibrio mimicus*, *Citrobacter freundii* y *Klebsiella pneumoniae*.

**STa.** Los dos tipos más comunes de STa producidas por *E. coli* son STh y STp. Estas toxinas consisten de 18 (STp) o 19 (STh) aminoácidos incluyendo seis cisteínas que forman puentes disulfuro intramoleculares. Ambos péptidos tienen un residuo terminal suficiente para otorgarle enterotoxicidad conociéndose como dominio tóxico. Este dominio presenta alta homología con los péptido endógenos guanilina, uroguanilina y linfoguanilina (Weiglmeier y col., 2010). Ambas STa, son traducidas como un péptido precursor de 72 aminoácidos que se someten a procesos proteolíticos intracelulares, para activarla como un péptido de 17 a 53 aminoácidos. Esta forma es transportada al periplasma, donde los puentes disulfuro se forman por una proteína DsbA cromosómicamente codificada. A través de un proceso indefinido, la pro-STa es transportada al periplasma por una vía de exportación dependiente de SecA. El péptido STa activo, se cree que es secretado a través de la membrana externa (Weiglmeier y col., 2010).

Las isoformas de STa, comparten una región terminal C conservada de 13 aminoácidos con tres puentes disulfuro responsables de su termo estabilidad y actividad biológica. En consonancia con la función propuesta para STa como un factor esencial de supervivencia de las bacterias, facilitando la huida desde ambientes nutricionalmente pobres a aquellos nutricionalmente ricos, tanto la síntesis como la secreción de STa se reducen en medios enriquecidos con glucosa mientras que la falta de este hidrato de carbono, las estimula. Investigaciones acerca de la patogénesis de la diarrea producida por STa, revelaron la presencia de las hormonas parácrinas, guanilina y uroguanilina, y el receptor para estos péptidos homólogos, guanilato ciclasa C (GC-C), codificado en el gen *GUCY2C* (Lucas y col., 2000; Lin y col., 2010).

Guanilato ciclasa C, es el único receptor identificado para STa, perteneciente a la familia de receptores guanilato ciclasa que catalizan la conversión de GTP en cGMP tras su activación. GC-C presenta la estructura de dominio conservado, incluyendo dominio de unión extracelular, un dominio simple transmembrana, un dominio intracelular homólogo a una quinasa y un dominio catalítico que produce cGMP (Lucas y col., 2000). GC-C se expresa principalmente en las células de la mucosa intestinal desde el duodeno hasta el recto, ubicado en la porción apical de los enterocitos tanto de las vellosidades como de las criptas. Los dos ligandos endógenos de GC-C, guanilina y uroguanilina, comparten una homología significativa con STa (estructura terciaria estabilizada por puentes disulfuro, esenciales para la actividad biológica; también son sintetizados como pro-péptidos). Esta característica, sugiere que STa y la diarrea enterotoxigénica son el primer ejemplo de imitación molecular y la convergencia de la evolución. Las bacterias se adaptaron a una función fisiológica normal de las células, la regulación del fluido intestinal y homeostasis electrolítica para producir un esquema de supervivencia evolutiva de la población que garantice adecuadas fuentes de nutrientes y diseminación en nuevos ambientes y hospedadores (Lin y col., 2010).

La activación de GC-C estimula el incremento del cGMP intracelular, el cual se une y activa sus tres efectores: proteína quinasa cGMP dependiente (PKG), fosfodiesterasas (PDEs) y canales cerrados de nucleótidos cíclicos (CNG). Altas concentraciones de cGMP intracelular, también pueden activar una proteína quinasa dependiente de cAMP (PKA). PKGs son los principales mediadores intracelulares para la señalización de cGMP (Lin y col., 2010).

El mantenimiento de la homeostasis de fluidos y electrolitos es fundamental para los procesos bioquímicos

celulares y el

funcionamiento de los

órganos, el intestino

es uno de los

principales órganos

controladores de ese

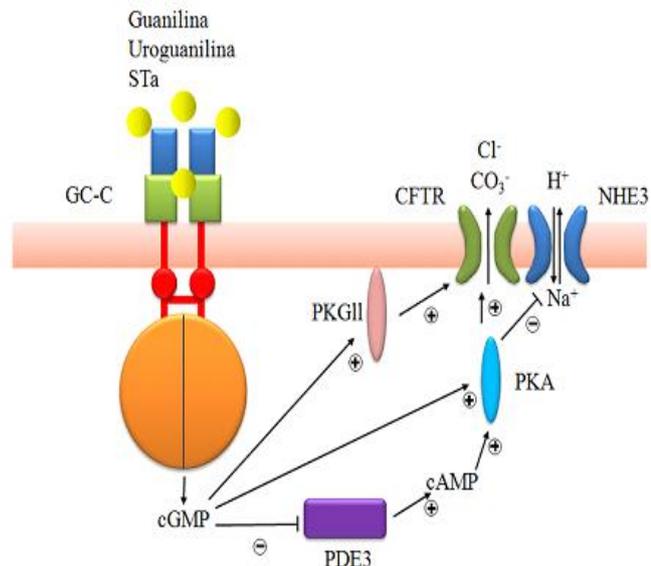
balance.

Fisiológicamente,

guanilina y

uroguanilina regulan

Figura 7. Esquematación del mecanismo de acción de la toxina termoestable STa



la homeostasis intestinal de fluidos y electrolitos a través de la acumulación de cGMP, que activa PKG conduciendo a la fosforilación de los canales reguladores de la conductancia transmembrana fibrosis quística (CFTR), produciendo Cl<sup>-</sup>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> y secreción de agua (Lucas y col., 2000). STa induce diarrea secretora utilizando este mecanismo fisiológico, dada su alta afinidad por GC-C, ocasionando la inducción suprafisiológica de acumulación de cGMP con una gran secreción de agua y electrolitos (Lin y col., 2010) (figura 7).

Igual que con LT, se propusieron mecanismos alternativos de acción, los cuales involucran prostaglandinas, calcio y al sistema nervioso entérico.

**STb.** La enterotoxina termoestable STb, se asocia principalmente con cepas ETEC de origen porcino, aunque también se encontraron aislamientos humanos y de otras especies animales (pollos, bovinos, perros, hurones y marmotas) (Dubreuil, 2008). STb, inicialmente es sintetizada como un precursor proteico de 71 aminoácidos, posteriormente procesado a una proteína madura de 48 aminoácidos con

una masa molecular de 5,2 kDa. Contiene cuatro residuos de cisteína que forman dos puentes disulfuro. Estos puentes son necesarios para la toxicidad de la molécula. Si bien esta toxina es termorresistente, es altamente susceptible a la degradación proteolítica (Dubreuil, 1997). Taillon y col, 2008, demostraron la presencia de una variante de STb, la cual se presenta con alta frecuencia y está distribuida entre diversos virotipos de ETEC, principalmente en STa:STb:Stx2 y STa:STb no fimbriadas. STb induce daños histológicos en el epitelio intestinal, como pérdida de vellosidades y atrofia parcial de las mismas. STb, reconoce como su receptor a un glicofingolípido llamado sulfátido. Esta molécula está presente en el epitelio intestinal de cerdos y humanos (Rousset y col., 1998). La región de la toxina involucrada en la unión con el sulfátido, su receptor y/o la expresión de la toxicidad está comprendida por un lazo rico en glicina. Para estimular la secreción de fluidos, la toxina debe estar internalizada. Una vez dentro de la célula hospedadora, se estimula una proteína reguladora de unión a GTP sensible a la toxina pertusis, ocasionando la entrada de calcio a través de la activación del canal de calcio cerrado receptor-dependiente, por una proteína quinasa II, calmodulina dependiente. Esto activa la apertura de un canal intestinal de iones y puede también activar una proteína quinasa C y consecuentemente CFTR. Los niveles incrementados de calcio regulan la actividad de las fosfolipasas A y C y la liberación del ácido araquidónico desde los fosfolípidos de membrana conduciendo a la formación de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) y 5-HT que median el transporte de agua y electrolitos fuera de las células intestinales. STb estimula la secreción de bicarbonato desde los enterocitos, lo que provoca su acumulación, junto con el aumento de la concentración de Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup>, en el lumen intestinal (Dubreuil, 1997).

STb está clasificada como una toxina citotónica y por definición este tipo de toxinas no afectan la estructura celular como consecuencia de su acción. Estudios realizados hasta 1984 corroboraban este concepto. Sin embargo, en 1985, se publicó el primer trabajo de inducción de alteración celular por STb (Whipp y col., 1985). STb

altera la longitud de las vellosidades en el yeyuno porcino pero no afecta la profundidad de las criptas. STb reduce marcadamente la tasa neta de absorción de fluidos. La exposición del yeyuno porcino a la toxina, induce alteraciones estructurales microscópicas de la mucosa intestinal, incluyendo el acortamiento de las vellosidades (una reducción del 11 – 19 %, pérdida de las células de absorción de las vellosidades y atrofia parcial), un incremento de las células epiteliales descamadas en el lumen y cambios en el epitelio, que pasa de columnar a cuboidal, en los extremos de las vellosidades más cortas consecuente con la capacidad de absorción comprometida (Dubreuil, 2008). STb induce la formación de poros en vesículas del ribete en cepillo del yeyuno porcino (Gonçalves y col., 2007). Estos poros podrían explicar la secreción de electrolitos observada en la colibacilosis ocasionada por STb. Los poros formados no son específicos, permitiendo el pasaje de aniones y cationes. Como algunas toxinas formadoras de poros pueden matar células eucariotas, STb podría ser responsable de la muerte celular, dando por resultado las alteraciones observadas en el epitelio intestinal (Dubreuil, 2008).

**EAST1.** La enterotoxina termoestable I característica de *E. coli* enteroagregativa (EAST1), es una toxina de bajo peso molecular, perteneciente a la familia de las enterotoxinas STa. EAST1 se descubrió como producto de algunas *E. coli* diarreigénicos en humanos. El gen *astA*, que codifica su producción, se encontró distribuido entre cepas ETEC de origen porcino. Varios de esos estudios, demostraron que el gen se detectaba comúnmente entre cepas ETEC F4 positivas, especialmente pertenecientes al serogrupo O149. Una combinación común entre los ETEC porcinos es LT+/F4+/EAST1+. Sin embargo el gen para EAST1 también se detectó en otros virotipos de ETEC F18+ (Fairbrother y col., 2005). El gen *astA* se encuentra en un gran plásmido de tamaño variable (58 Kb en ETEC O141 y 85 Kb en ETEC O149) presentando 98 % de homología con el correspondiente gen perteneciente a aislamientos de origen humano. El gen *astA* también

se informó en EHEC O157:H7 (en la cual podría permanecer inactivo), en un alto porcentaje de ETEC y EPEC humanas y en cepas de *E. coli* de niños sin diarrea (Fairbrother y col., 2005).

El papel de EAST1 en el desarrollo de la diarrea es controversial. EAST1 incrementa la concentración de cGMP dentro de los enterocitos. Se cree que esta toxina, basados en la similitud que presenta con STa (las regiones funcionales de ambas comparten 50 % de homología) y la elevación de los niveles cGMP, podría actuar de forma similar a STa. El efecto de EAST1 sobre la inducción de pérdida de electrolitos, aún no se ha demostrado (Dubreuil, 1997).

**1.1.8.2 Factores de colonización.** Los mecanismos por los cuales las cepas ETEC se adhieren y colonizan la mucosa intestinal, fueron objeto de numerosas investigaciones. Para producir diarrea, las cepas ETEC deben adherirse a los enterocitos del intestino delgado a través de sus fimbrias de superficie o adhesinas no fimbriales. Se caracterizaron una gran cantidad de antígenos fimbriales de ETEC. La heterogeneidad antigénica conferida por la existencia de múltiples antígenos fimbriales es un obstáculo para el desarrollo de una vacuna efectiva. Las fimbrias le otorgan a las cepas ETEC, especificidad de especie: las productoras de F5 son patógenas para bovinos, ovinos y cerdos mientras que las que expresan F4 son capaces de producir enfermedad sólo en cerdos. Las cepas humanas de ETEC poseen su propio grupo de fimbrias de colonización, los CFA (*colonization factor antigens*). Los CFA se pueden dividir en función a sus características morfológicas. Existen tres variedades morfológicas importantes: bastones rígidos (CFA/I), bastones flexibles (CFA/III) y estructuras delgadas y flexibles (CFA/II y CFA/IV).

Los genes que codifican estas estructuras están localizados en plásmidos, que también llevan los genes para ST y/o LT. Este grupo de

genes fimbriales codifican para una subunidad fimbrial primaria proteica y para proteínas accesorias que se requieren para el procesamiento, secreción y conformación de la estructura fimbrial (Nataro y Kaper, 1998).

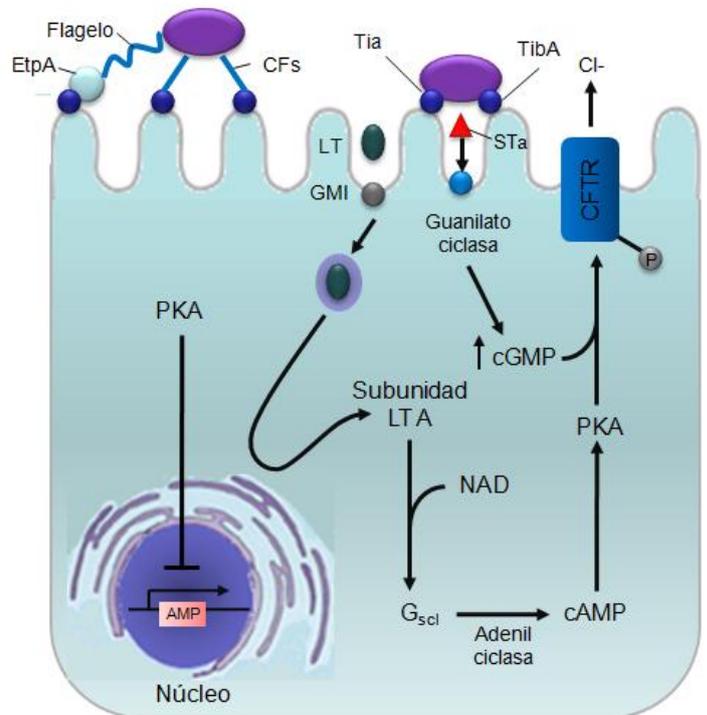
Las fimbrias F4, proteínas de superficie filamentosas y poliméricas, están presentes en cepas ETEC responsables de diarrea y mortalidad neonatal en lechones destetados. Consisten en una subunidad mayor (FaeG) con subunidades menores (FaeF, FaeH, FaeC y probablemente FaeI). Se describieron diferentes serotipos de F4: F4ab, F4ac y F4ad. Las fimbrias F4 le permiten al microorganismo adherirse a receptores específicos presentes en las vellosidades de los enterocitos y, consecuentemente, colonizar el intestino delgado. Al considerar las tres variantes de F4 (F4ab, F4ac y F4ad) y teniendo en cuenta la adhesividad por el ribete en cepillo de los enterocitos, los cerdos pueden distinguirse en seis fenotipos: fenotipo A, adhiere las tres variantes; fenotipo B, adhiere F4ab y F4ac; fenotipo C, a F4ab y F4ad; fenotipo D, a F4ad; fenotipo E a ninguna variante y fenotipo F, adhiere F4ab. Con respecto a los receptores, se describieron los siguientes modelos: receptor *bcd*, encontrado en el fenotipo de cerdos A; receptor *bc* en cerdos fenotipo A y B; receptor *d*, en cerdos C y D; y receptor *b*, en cerdos F (Van den Broeck y col., 2000).

En las últimas décadas, se describieron nuevas características potencialmente virulentas, como nuevo pili (tipo IV) (Pitchel y col., 2002), proteínas para la invasión celular, proteínas de autotransporte y citolisina (Nagy y Fekete, 2005).

**Figura 8. Esquematación del mecanismo de patogenicidad de ETEC**

ETEC se une a los ETEC

enterocitos del intestino delgado a través de factores de colonización (CFs) y de una adhesina que se encuentra en la punta de los flagelos (EtpA). La adherencia estricta está mediada por Tia y por TibA. Las enterotoxinas termolábil (LT) y termoestable (STa), se secretan y producen diarrea a través de la



activación del regulador transmembrana de fibrosis quística (CFTR) por cAMP y cGMP (Croxen y Finlay, 2010 adaptado por Martín Carriquiriborde).

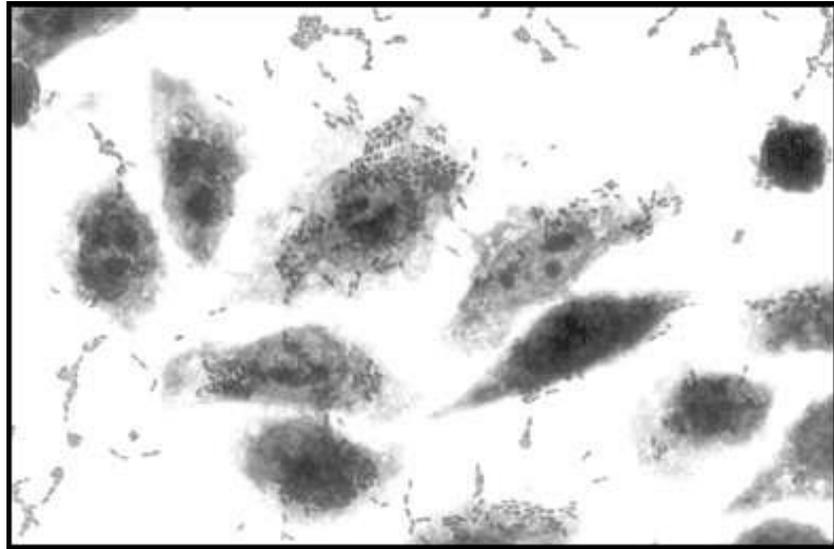
### 1.1.9 *Escherichia coli* enteroagregativo (EAEC)

*Escherichia coli* enteroagregativo (EAEC), es el patotipo más recientemente descrito. Se define como una cepa de *E. coli* que no secreta enterotoxinas LT o ST y que produce un patrón de adherencia distinto en células Hep-2, denominado adherencia agregativa (AA). Este patrón se distingue por una exacerbada autoaglutinación bacteriana en la superficie celular con una configuración similar a una pila de ladrillos (Nataro y col., 1998; Bolton y col., 2006). EAEC está surgiendo como un patógeno diarreico significativo en múltiples grupos de población. Aunque la asociación más frecuente es diarrea pediátrica en países en vías de desarrollo, EAEC también está relacionado con diarrea en adultos incluyendo viajeros, pacientes HIV positivos y fue causa de brotes de enfermedad transmitida por alimentos en el mundo industrializado. Los datos actuales sugieren que no existe un grupo de factores de virulencia asociado a todas las EAEC, sino que prevalece la combinación de múltiples factores. Se cree que en la patogénesis de EAEC están involucrados tres pasos: a) Se inicia en la región terminal del íleon y colon con la adherencia de los microorganismos formando el patrón característico a través de una o varias fimbrias de adhesión agregativa hidrofóbicas (AAF); b) Las bacterias producen una película mucosa sobre la superficie de los enterocitos; c) Las bacterias liberan toxinas que alteran la respuesta inflamatoria, secreción intestinal y toxicidad en la mucosa. Los aspectos de cada uno de estos pasos, implican características codificadas en plásmidos (Johson y Nolan, 2009). Los factores de virulencia de EAEC que pueden participar en la patogénesis son, estructuras fimbriales que forman manojos de finos filamentos denominadas AAF (*aggregative-adherence-fimbriae*), codificados por un plásmido de 65 Kb llamado pAA (Nataro y col., 1998; Bolton y col., 2006). Se describieron tres variantes de AAF en función a las variaciones de la secuencia de aminoácidos de la subunidad mayor de pilina. AAF/I, AAF/II y AAF/III codificadas por los genes *aggA*, *aafA* y *agg3A*, respectivamente (Boisen y col., 2008). En estudios epidemiológicos, las cepas EAEC no expresan ninguna de las tres variantes AAF conocidas, a pesar de la presencia del

regulador AggR y otros genes de pAA. Estos hallazgos sugieren la presencia de variantes de adhesinas adicionales AAF aún no caracterizadas (Harrington y col., 2006; Boisen y col., 2008). En la mayoría de los casos EAEC expresa sólo un posible AAF alelo. Los genes para la biogénesis de AAF funcionan como una organización similar a la de las adhesinas fimbriales Dr, presentes en *E. coli* uropatógeno y *E. coli* de adherencia difusa. Sumado a las proteínas chaperonas necesarias para el ensamblaje de las estructuras Dr, AAFs incluye un gen que codificaría una subunidad menor de pilina (*aafB*), el cuál podría mediar la invasión de la célula epitelial. Si bien algunos investigadores sugieren que EAEC es un patógeno invasivo, hay otros tantos que no están de acuerdo con esta posición (Harrington y col., 2006). La expresión de los genes AAF requiere un activador transcripcional AggR, de la clase AraC. Esta proteína regula los genes involucrados en la biogénesis fimbrial tanto para AAF/I como AAF/II (Harrington y col., 2006). El paradigma patogénico imperante de EAEC, incluye la colonización de la mucosa intestinal seguida por la elaboración de una o más citotoxinas y enterotoxinas, de las cuales ya se describieron tres: *Shigella* enterotoxina 1 (ShET1), una toxina codificada en un plásmido (Pet) (toxina con masa molecular de aproximadamente 110 kDa perteneciente a la familia de proteínas denominada Serinas Proteasas de Autotransporte de Enterobacteriaceae, SPATE, actúa en el citosol de la célula epitelial hospedadora alterando la arquitectura del citoesqueleto de actina) (Navarro-García y col., 2010) y la toxina termo estable *E. coli* enteroagregativa (EAST1). Ninguna de estas toxinas están bajo regulación de AggR, aunque se encuentran con mayor frecuencia en cepas *aggR* positivas que en las negativas (Boisen y col., 2008).

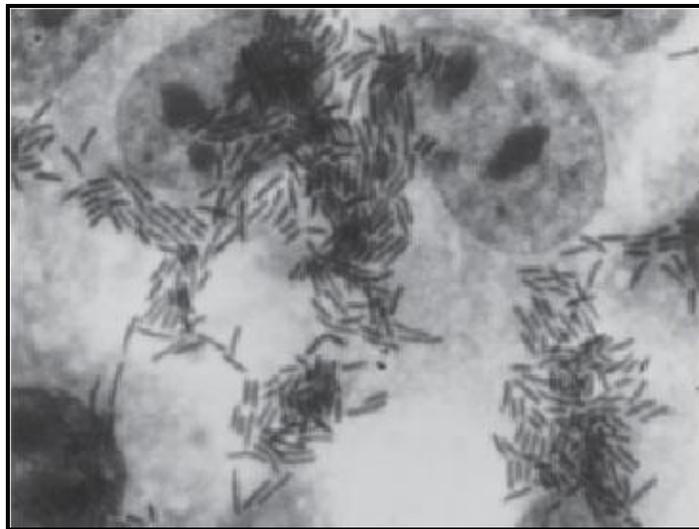
Las lesiones histopatológicas causadas por EAEC, se caracterizan por el acortamiento de las vellosidades intestinales, necrosis de las microvellosidades y una respuesta inflamatoria leve con edema e infiltración de la submucosa (Nataro y col., 1998) (Imágenes 4, 5 y Figura 9).

**Imagen 4. Patrón de adherencia agregativa en células HEp-2**



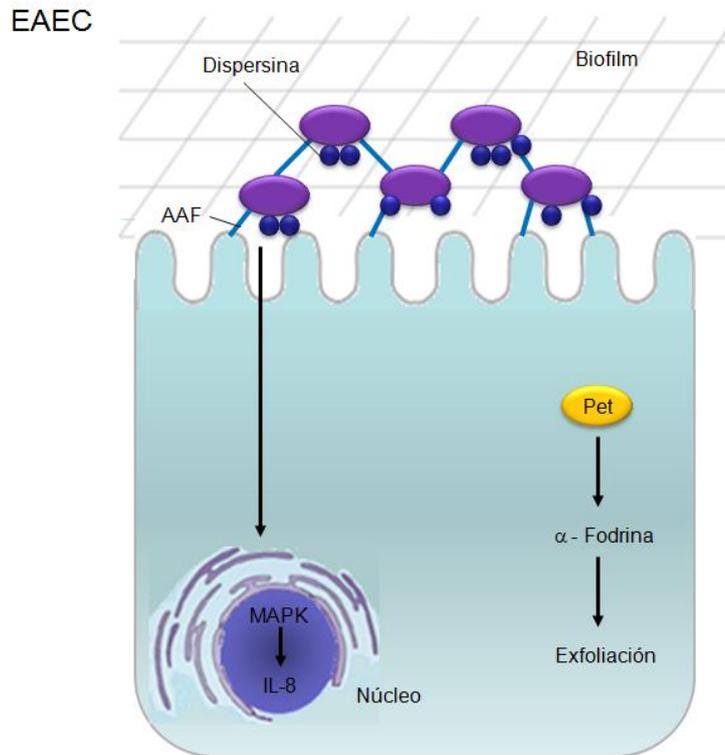
(de Nataro y col., 1998)

**Imagen 5. Adherencia agregativa que define a EAEC**



Las bacterias se adhieren tanto a las células como al cubreobjetos con su típica apariencia de bloques apilados.

(Aumento: X 1,000) (de Rüttler y col., 2006)

**Figura 9. Esquematación del mecanismo de patogenicidad de EAEC**

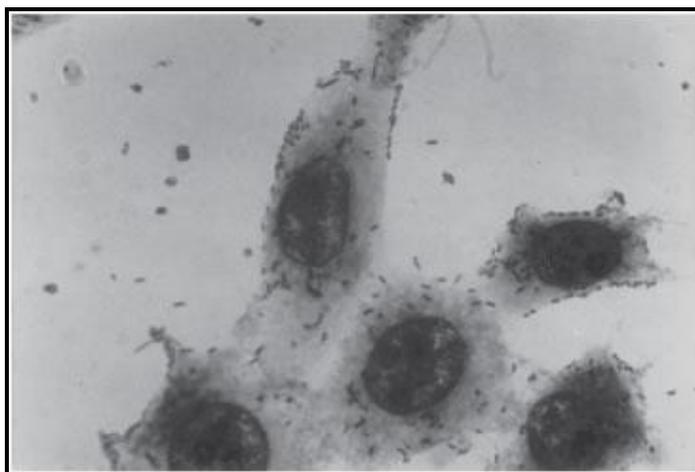
EAEC se une a los enterocitos del intestino delgado y grueso a través de las fimbrias de adhesión agregativa (AAF) quienes estimulan la fuerte respuesta de la interleuquina 8 (IL-8), que permite la formación de biofilms sobre la superficie de las células. La toxina codificada en un plásmido (Pet), es una serina proteasade autotransporte de Enterobacteriaceae (SPATE) cuyo blanco es la  $\alpha$ -fodrina (SPTAN1),

encargada de destruir el citoesqueleto de actina e inducir la exfoliación (Croxen y Finlay, 2010 adaptado por Martín Carriquiriborde).

### 1.1.10 *Escherichia coli* de adherencia difusa (DAEC)

Este patotipo de *Escherichia coli* está caracterizado por su patrón de adherencia difusa en células HEP-2, la presencia de adhesinas de la familia Afa/Dr o la ausencia de otros genes típicos de los otros patotipos de *E. coli* (Bolton y col., 2006) (Imagen 6). Aunque el papel enteropatogénico de DAEC no está claramente demostrado, se cree que pueden causar diarrea en niños mayores de un año de edad y en adultos (Nataro y Kaper, 1998). El patrón de adherencia, también observado en cepas EPEC, está mediado por estructuras fimbriales (Bolton y col., 2006). Se describieron dos tipos de adhesinas: la fimbria F1845 codificado por el gen *daaC* (Bolton y col., 2006) y una proteína de la membrana externa conocida como AIDA-I (*adhesin involved in diffuse adherence*). Tras adherirse al epitelio intestinal provocan una elongación de las microvellosidades que engloban las bacterias sin que se produzca una invasión interna (Nataro y Kaper, 1998). Algunas cepas DAEC también pueden llevar un sistema de secreción tipo III, similar al observado en EPEC y EHEC. También se publicó la presencia del gen que codifica la producción de la toxina EAST1 (Bolton y col., 2006).

#### Imagen 6. Adherencia Difusa típica de DAEC



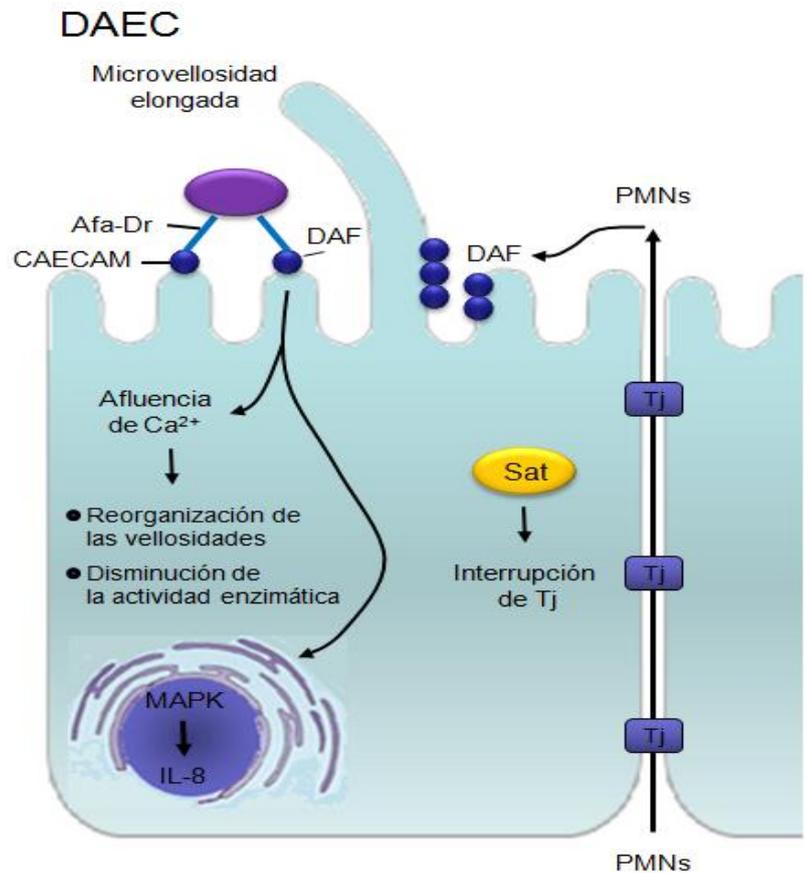
Las bacterias se encuentran dispersas sobre la superficie celular. (Aumento: X 1,000) (de Rüttler y col., 2006)

**Figura 10. Esquematzación del mecanismo de patogenicidad de DAEC**

DAEC forma un patrón de adherencia difusa sobre los enterocitos del intestino delgado, a través de adhesinas fimbriales y no fimbriales (Afa), en general conocidas como fimbrias Afa-Dr. La mayoría de las fimbrias Afa-Dr se asocian a un factor complementario de decaimiento-aceleración (DAF); otro grupo se une a los receptores de la familia de moléculas del antígeno carcinoembriogénico

relacionado con células de

adhesión (CEACAM). La toxina de autotransporte Sat está asociada con las lesiones producidas en las uniones intercelulares (TJs) y con el incremento de la permeabilidad. La infiltración de leucocitos polimorfonucleares (PMN), incrementa la cantidad de DAF en la superficie celular (Croxen y Finlay, 2010 adaptado por Martín Carriquiriborde).



### 1.1.11 *Escherichia coli* productor de toxina Shiga (STEC o VTEC)

*Escherichia coli* productor de toxina Shiga (STEC) o verotoxina (VTEC), se caracteriza por la producción de citotoxinas que inhiben la síntesis proteica. Las toxinas pueden denominarse indistintamente verotoxina, debido a su actividad sobre células Vero o toxina Shiga, debido a su similitud con la toxina producida por *Shigella dysenteriae*. En términos generales, STEC se utiliza principalmente en Estados Unidos mientras que VTEC se lo emplea en Europa (Bolton, 2011). La similitud entre la secuencia de aminoácidos de Stx producida por *E. coli* es particularmente alta con respecto a la producida por *S. dysenteriae* (sólo un aminoácido). Además de *E. coli* y *S. dysenteriae*, las toxinas variantes de toxinas Stx también son expresadas por otros géneros bacterianos como *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Acinetobacter*, *Campylobacter* y *Hamiltonella* (Mauro y Koudelka, 2011).

STEC es el grupo más importante de patógenos emergentes asociados a Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA). *E. coli* O157:H7, fue identificado por primera vez como patógeno humano en 1982, durante dos brotes de colitis hemorrágica ocurridos en Oregon y Michigan, Estados Unidos, atribuidos al consumo de hamburguesas en restaurantes de una cadena de comidas rápidas (Riley y col., 1983). La infección por STEC puede ocasionar casos esporádicos o brotes de diarrea, colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico (SUH). En Argentina, el SUH es endémico y constituye la primera causa pediátrica de insuficiencia renal aguda y la segunda de insuficiencia renal crónica; además es responsable del 20 % de los trasplantes renales en niños y adolescentes (Rivas y col., 2006). Si bien el serotipo O157:H7 es el responsable de la mitad de las infecciones por STEC confirmadas en Europa, existe una preocupación creciente sobre el riesgo de los serotipos de STEC no-O157 para la salud pública (Bolton y col., 2006).

Los rumiantes, especialmente los bovinos, son la fuente directa e indirecta más frecuente de *E. coli* O157:H7 (Sanz y col., 1998; Parma y col., 2000a). El microorganismo

coloniza el tracto gastrointestinal de los bovinos, principalmente a través de la internalización en el epitelio de la mucosa adyacente a la región recto-anal, pudiéndose considerar un organismo comensal que no causa enfermedad (Sheng y col., 2011).

No todas las cepas STEC son perjudiciales para la salud pública, Hussein, 2007, publicó un listado de serotipos patógenos y no patógenos. Dentro de los STEC que producen enfermedad, las diferencias de la virulencia de los distintos serotipos se puede atribuir a factores específicos codificados en la isla de patogenicidad LEE, adquirida horizontalmente. En la patogénesis de STEC, además de LEE, están involucrados otros factores de virulencia (Bolton, 2011).

Los factores de virulencia presentes en STEC pueden tener localización cromosomal o plasmídica. El cromosoma de STEC lleva una serie de genes que codifican la producción de diversos factores de virulencia, incluyendo *stx*<sub>1</sub>, *stx*<sub>2</sub>, genes LEE, *ure*, *hep*, *ecp*, *efa1*, *cah*, *iha*, *chuA*, *efa*, *fepC*, *paa*, *nle*, *rbc*, *set* y *eibG* (Bolton, 2011). En general, el fago que codifica Stx2, tiene una organización tipo lambda. Los fagos que codifican Stx1 pueden tener una organización similar a la anterior o pueden estar constituidos por diferentes grupos de genes homólogos. Según el Manual Bergey, las toxinas Shiga se clasifican en 6 tipos 1, 2, 2c, 2d, 2e y 2f, que agrupan a 22 toxinas. Actualmente, esta clasificación fue ampliada y se propusieron 12 tipos de Stx: Stx1a, Stx1b, Stx1c, Stx1d, Stx2a, Stx2b, Stx2c, Stx2d, Stx2e, Stx2f, Stx2g, y Stx2h, y 31 variantes (Scheutz y Strockbine, 2005). Bolton, 2011, menciona la existencia de dos tipos de toxinas Stx denominadas Stx1 y Stx2. Stx1 con tres variantes (Stx1, Stx1c y Stx1d), mientras que el grupo Stx2, altamente heterogéneo, que consiste en Stx2c, Stx2dact, Stx2d, Stx2e, Stx2f y Stx2g. Las cepas productoras de Stx1 se encuentran principalmente en bovinos con diarrea, mientras que las cepas productoras de Stx2, son las que predominan en animales adultos especialmente en Argentina (Sanz y col., 1998; Parma y col., 2000a; Padola y col, 2004; Bolton, 2011). Las cepas STEC de origen humano, animal

o de alimentos pueden producir un determinado tipo de Stx, solas o en combinación de dos o más toxinas.

Stx son toxinas tipo AB<sub>5</sub> (subunidad enzimática A en asociación no covalente con cinco subunidades B, que poseen tres actividades celulares diferentes: a) ARN N-glicosidasa que inhibe la síntesis proteica; b) Señal de transducción que produce apoptosis y c) Inhibición de la replicación viral (Bolton, 2011). Las diferencias en la especificidad de Stx, pueden deberse a la variación en los genes que codifican las subunidades B (*stxB*<sub>1</sub>, *stxB*<sub>2f</sub>). El receptor glicolipídico para Stx es globotriosilceramida (Gb3) (Gb4 en el caso de Stx2e), que se encuentra sobre las células endoteliales. La toxina es internalizada mediante un proceso de endocitosis. Un fragmento de la subunidad A con el N-glucósido son liberados al citosol, removiendo un grupo adenina del rRNA de la célula hospedadora. Esto se traduce en la inhibición de la síntesis proteica, precipitando la apoptosis de la célula eucariota. Citoquinas como TNF- $\alpha$  e IL1- $\beta$ , se cree que son producidas por la estimulación que Stx realiza sobre los monocitos, potenciando la acción de la toxina sobre las células endoteliales, a través de la regulación del receptor celular (Karmali y col., 2010).

Algunas cepas STEC, producen una citotoxina adicional AB<sub>5</sub>, letal para ratones y que también produce extenso daño microvascular, trombosis y necrosis en varios órganos, incluyendo cerebro, riñones e hígado. La nueva toxina se llamó citotoxina subtilasa. La subunidad B, al igual que lo que ocurre con Stx, forma un pentámero que se une a receptores glicolipídicos ubicados sobre la superficie celular. El prototipo de citotoxina subtilasa (SubAB) se detectó en la cepa STEC O113:H21 LEE negativa, responsable de un pequeño brote de SUH en Australia. Está codificada por dos genes (*subA* y *subB*) ubicados en el plásmido conjugativo pO113 (Paton y Paton, 2005).

Otros genes que pueden estar presentes en el cromosoma de STEC es el grupo *ure*, el cual está formado por tres genes estructurales *ureA*, *ureB*, *ureC* y cuatro genes accesorios *ureD*, *ureE*, *ureF* y *ureG*. Si bien está establecido su rol en el transporte y

procesamiento de ureasa, también pueden tener un importante rol en la colonización y patogénesis de *E. coli* O157:H7 (Bolton, 2011). Este serotipo también produce un pili tipo IV, llamado pili de coli hemorrágico (HCP), involucrado en el proceso de invasión de los enterocitos, formación de biofilm, movilidad, e inducción de la secreción de citoquinas proinflamatorias por parte de las células epiteliales intestinales (Ledesma y col., 2010). También produce otro pili denominado pili común de *E. coli* (ECP), quién juega un rol importante en la adherencia y colonización. STEC LEE-positivas pueden producir otras adhesinas putativas como Efa1 y Cah (codificadas por *efa1* y *cah*). Efa1 está asociada con los serotipos vinculados con brotes epidémicos o enfermedad severa. Cah es una proteína de autotransporte presente en EHEC. *Iha* es un gen que regula el hierro (*IrgA*), presente en aislamiento LEE positivos y negativos y se relaciona con serotipos específicos. Si bien su función está esclarecida, podría actuar como una adhesina en lugar de la intimina. El gen *chuA*, codifica un receptor proteico de membrana externa que sirve para el transporte de proteínas y está involucrado con la utilización del grupo hem. El gen *efa* codifica un factor de adherencia en EHEC y es idéntico a *lifA* (inhibidor de la activación de linfocitos). Estos genes se encuentran presentes en aquellas cepas que producen la típica lesión A/E. El gen *fepC* codifica una enterobacterina férrica asociada al transporte de proteínas de unión del ATP. El gen *paa*, codifica una proteína porcina asociada a lesiones A/E. Las infecciones por STEC también involucran moléculas efectoras no-LEE (Nle), codificadas en profagos, que tienen gran variedad de funciones, incluyendo inhibición de la fagocitosis, invasión, citotoxicidad, adherencia bacteriana. El gen *set* (también conocido como *ent* o *sen*) codifica probablemente, una enterotoxina similar a ShET2 producida por *Shigella flexneri* (Bolton, 2011).

Los plásmidos transportadores de genes de virulencia que presenta STEC son:

a) pO157, es un plásmido de 92 Kb que contiene los genes/operones *ehxA*, *epC-O*, *toxB*, *espP*, *kat*, *stcE* y *ecf*. Su presencia es necesaria para que EHEC exprese

virulencia completa. El gen *ehxA*, codifica la producción de una enterohemolisina (Ehly) cuya función durante la infección es la de liberar la hemoglobina presente en los glóbulos rojos, proveyendo a las bacterias de una fuente de hierro. Es una proteína perteneciente a la familia de las RTX, citolisinas formadoras de poros (Beutin y col., 1989). Ehly es responsable del fenotipo enterohemolítico observado entre las cepas STEC O157 y no-O157, también se observó en STEC *eae*-positivas y *eae*-negativas (Schmidt y col., 1995). Esta toxina es necesaria para el desarrollo de la infección en humanos y está presente en aislamientos STEC de origen bovino, otorgando mayores evidencias acerca de la relación STEC bovinas y enfermedades en humanos (Von Muffling y col., 2007). Los genes *etpC* al *O*, codifican una vía de secreción tipo II; *toxB*, potencial adhesina necesaria para la completa expresión de adherencia de O157:H7; *espP*, una serina extracelular y un sistema de autotransporte EspP, con actividad citotóxica, parecen tener efecto sinérgico con la enterohemolisina, durante el desarrollo de la enfermedad hemorrágica; *katP*, catalasa-peroxidasa; *stcE*, inhibidor de estearasa C1. También contiene al operón *ecf* que codifica enzimas modificadoras de la estructura de los lipopolisacáridos, optimizando la estructura e integridad de las membranas, de esta manera se ve facilitada la supervivencia y persistencia bacteriana en un amplio rango de ambientes adversos y diversos encontrados en animales, humanos, granjas y alimentos (Bolton, 2011).

b) pO113, es un megaplásmido que contiene los genes *saa*, *lpf* y *sab*. El gen *saa*, codifica una adhesina autoaglutinante de STEC (Saa) asociada especialmente a cepas no-O157 LEE negativas, si bien no son muy frecuentes, se asociaron con el serotipo O113:H12 productor de SUH. Paton y col., 2001, publicaron la presencia de una gran fimbria polar (LPF) codificada por el operón *lpf*. *E. coli* O157:H7 puede presentar los operones *lpf1* y *lpf2* o ambos, y están asociados con el incremento de la adherencia, la habilidad de colonización y la persistencia de la infección. En el caso del operón *lpf2* se asoció con el desarrollo de diarreas severas (Osek y col., 2003b). Torres y col., 2009, identificaron

polimorfismo dentro de los genes *lpfA*, característica utilizada para clasificar a la subunidad fimbrial mayor en distintas variantes. Galli y col., 2010, analizaron STEC LEE-negativas aisladas de humanos y bovinos de la República Argentina y observaron que la variante más comúnmente encontrada en las cepas bovinas era la codificada por el gen *lpfA2-1* mientras que el genotipo combinado *lpfA1-2* y *lpfA2-1* fue el más común en aislamientos humanos. El gen *sab* codifica, un sistema de autotransporte involucrado en la formación de biofilm (Herold y col., 2009).

Patogénesis. Al igual que la gran mayoría de *E. coli*, las cepas O157:H7 y otras STEC, tiene gran resistencia a los ambientes ácidos y con presencia de sales biliares. Este fenotipo es mediado por el gen *rpoS* que codifica un factor sigma de fase estacionaria que le permite sobrevivir largos períodos a pH por debajo de 2,5. Una vez ingeridas, sobreviven sin dificultad el pasaje a través del estómago e intestino delgado, contribuyendo con estas características los productos codificados por los genes *ure*, *ecf*, *katP* y *stcE*. Una vez colonizado el intestino grueso, entran en contacto con los enterocitos, a través de las adhesinas fimbriales codificadas por los genes *hep*, *ecp* y *efa*, desencadenando la expresión de los genes presentes en LEE (Bolton, 2011). La regulación de los genes de virulencia es crítico para que la bacteria despliegue sus factores de virulencia en el lugar adecuado, en el momento adecuado y bajo condiciones ambientales apropiadas. Se realizaron innumerables investigaciones acerca de la regulación de los dos principales atributos de virulencia de STEC, LEE y toxina Shiga. La regulación de los genes de LEE es compleja, e involucra reguladores codificados y no codificados por LEE. En general, los reguladores no codificados, incluye H-NS, el cual actúa como represor e IHF, que lo hace como activador (Barba y col., 2005); dentro de los codificados por LEE se encuentran moléculas autoinductoras llamadas *quorum sensing* (Clarke y Sperandio, 2005; Gyles, 2007). ToxB, también estaría involucrada en la detección extracelular de señales que estimulan la expresión de LEE. El TTSS conecta el citoplasma bacteriano con el de la célula

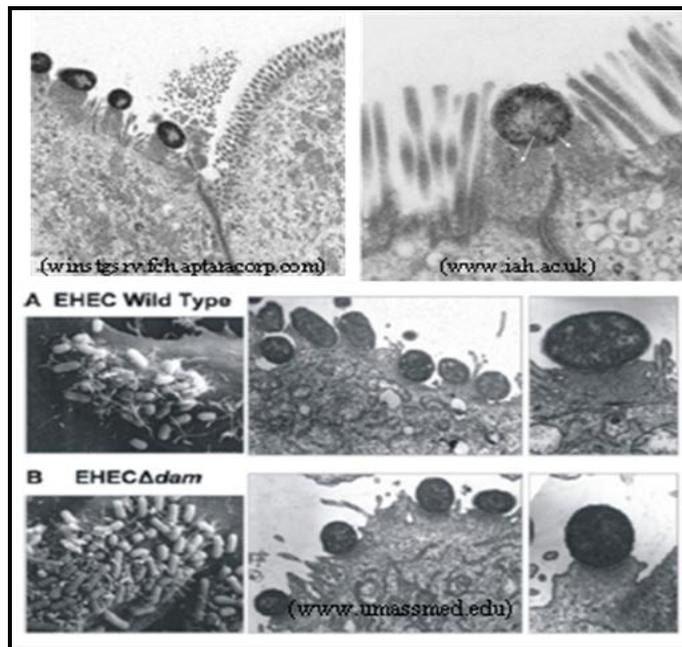
hospedadora. La proteína Tir (producto de los genes *tir/espE*) es transportada a través del TTSS y localizada en la membrana de las células hospedadoras, siendo su función ser el receptor para la intimina. En este momento, se inyectan dentro del enterocito una gran cantidad de proteínas, incluyendo los productos de *rtx*, *ehxA*, *fepC* y *efa1/lifA* conjuntamente, con moléculas Nle, cuyas funciones se describieron previamente. Dentro de la célula hospedadora, también se activan otras vías de señalización que ocasionan la destrucción de las microvellosidades y la reestructuración del citoesqueleto, formando el típico pedestal característico de la lesión A/E. En cepas STEC LEE-negativas, la adhesión está mediada por Saa y LPF (Bolton, 2011).

Una vez que se produjo la adherencia, se liberan las toxinas Shiga. Como los genes que codifican la producción de estas toxinas se encuentran en un bacteriófago lisogénico, su producción y liberación, dependen de que el fago active su ciclo lítico. Esta inducción, puede ocurrir luego del daño del ADN bacteriano ya sea por agentes tóxicos o antimicrobianos. Como consecuencia de la lisis de las células hospedadoras se liberan más fagos libres que infectarán a otras bacterias (Bolton, 2011). Luego de la liberación de las toxinas en el lumen intestinal, se induce la producción de interleuquina 8. Durante la inflamación resultante, la migración de los leucocitos polimorfonucleares dentro del lumen intestinal, facilita el pasaje de toxina Shiga dentro de la submucosa. Las toxinas son transportadas al torrente sanguíneo, posiblemente unidas a leucocitos circulantes, a sitios ricos en receptores Gb3 como son los glomérulos renales, epitelio del túbulo proximal renal, y en el cerebro. Luego de la unión con su sitio blanco, la toxina es internalizada por un proceso de endocitosis, desarrollándose la cascada de acontecimientos previamente descritos (Bolton, 2011).

El borrado de las microvellosidades, la inflamación y la secreción activa de cloro en el intestino grueso, ocasionan diarrea acuosa. El daño de los pequeños vasos sanguíneos ocasionados por las toxinas produce la diarrea sanguinolenta, mientras que el daño renal mediado por las toxinas Shiga es la principal causa de SUH (Gyles, 2007).

En las siguientes fotografías se observan las típicas lesiones A/E (barrido de las vellosidades y formación del pedestal) producidas por cepas EHEC (Figura 3).

**Imagen 7. Lesiones de barrido de vellosidades intestinales y formación de pedestal producidas por cepas de EHEC**



### 1.1.12 Aislamiento y Tipificación de *Escherichia coli*

#### 1.1.12.1 Métodos tradicionales

- **Cultivo.** *E. coli* patogénico representa un grupo de bacterias, fenotípicamente diverso. Se describieron varios métodos con la finalidad de detectar y/o aislar estos microorganismos a partir de diferentes tipos de muestras (FDA BAM; Konemann y col., 1999).
- **Tipificación bioquímica.** El método convencional de identificación de *E. coli* implica la utilización de una serie de pruebas bioquímicas (Konemann y col., 1999), que pueden realizarse de manera tradicional o mediante algún sistema comercial, como pueden ser las galerías multisustrato API 20E.
- **Serotipificación.** La serotipificación se basa en la utilización de antisueros y la detección de los antígenos somáticos O y flagelares H, presentes en estos microorganismos.
- **Ensayos de adherencia en células Hep-2.** Uno de los ensayos fenotípicos más útiles para el diagnóstico de *E. coli* diarreigénicos, es el ensayo de adherencia en células Hep-2. Fue descrito por primera vez en 1979, por Cravioto y col. En la actualidad, el aislamiento y el ensayo de adherencia en células Hep-2, continúan siendo *gold standard* para el diagnóstico de EAEC y DAEC (Nataro y Kaper, 1998; Weintraub 2007).
- **Ensayos de toxicidad en células Vero.** La capacidad de STEC para producir vero toxinas, puede ser evaluado mediante la capacidad de inducir efectos citopáticos sobre células Vero.

### 1.1.12.2 Métodos moleculares

Las cepas de *E. coli* diarreigénicas se encuentran dentro de los primeros patógenos por los cuales comenzaron a desarrollarse métodos de diagnóstico moleculares. En verdad, estos métodos son las técnicas más difundidas y realizables para diferenciar cepas diarreigénicas de los miembros no-patógenos de la flora intestinal. La prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), representa el mayor avance ocurrido en la biología molecular para el diagnóstico de microorganismos patógenos en general y de estas bacterias en particular (Lortie y col., 1991; Woodward y col., 1992; Ojeniyi y col., 1994; Beutin y col., 1995; Blanco y col., 1997; Fagan y col., 1999; Botteldoorn y col., 2003; Toma y col., 2003; Vidal y col., 2004; Chapman y col., 2006).

### 1.1.13 Subtipificación

Los métodos de subtipificación son esenciales en estudios de vigilancia y epidemiología de infecciones, particularmente en la investigación de brotes. Los siguientes métodos se pueden utilizar para demostrar si aislamientos individuales pueden, o no, estar epidemiológicamente relacionados (O'Sullivan y col., 2006).

#### 1.1.13.1 Métodos fenotípicos

- **Determinación de biotipos o perfiles bioquímicos.**

Los perfiles bioquímicos involucran las reacciones de aislamientos de *Escherichia coli* frente a diversas pruebas bioquímicas, por ejemplo fermentación de hidratos de carbono.

- **Determinación de serotipos.** La serotipificación se

basa en la utilización de antisueros y la detección de los antígenos somáticos O y flagelares H, presentes en estos microorganismos.

### 1.1.13.2 Métodos genotípicos

Los métodos de subtipificación molecular permiten la identificación de clones bacterianos. Presentan mayor poder discriminatorio y reproducibilidad que las técnicas basadas en características fenotípicas. Para subtipificar *E. coli* se utilizaron diferentes técnicas. Entre ellas se encuentran:

#### **Basadas en restricción enzimática**

**-RFLP** (*Restriction Fragment Length Polymorphism*). Esta es una técnica altamente reproducible en la que se generan bandas de restricción de ADN, dependiendo de la localización dentro del genoma de dianas de reconocimiento para endonucleasas de restricción específicas (Grimm y col., 1995; Osek, 2000b; da Silveira y col., 2002; Sugimoto y col., 2011). Su desventaja es el bajo poder discriminatorio.

**-PFGE** (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*). Técnica que se basa en la comparación de patrones de bandas generadas después de la digestión enzimática de todo el genoma bacteriano tras someterlo a una electroforesis multidireccional. Se considera el método de subtipificación *gold standard* de *E. coli* O157 (Osek, 2000a; O'Sullivan y col., 2006; Miko y col., 2010; Lienemann y col., 2012).

#### **Basadas en PCR**

**-RAPD** (*Random Amplification of Polymorphic DNA*). Mediante esta técnica se reconocen y amplifican secuencias al azar dentro del ADN genómico, obteniéndose patrones de bandas característicos (da Silveira y col., 2002; Leung y col., 2004; Kim y col., 2005).

**-REP-PCR** (*Repetitive Extragenic Palindromic PCR*). Esta técnica está basada en la amplificación de elementos palindrómicos extragénicos repetitivos dentro del genoma bacteriano. Su elección se debe, en parte, a su bajo costo, operatividad sencilla y

exitoso poder de discriminación (Borges y col., 2003; Hahm y col., 2003; Lu y col., 2005; Duan y col., 2009).

**-ERIC-PCR** (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus PCR*). Las secuencias repetitivas intergénicas de consenso de las enterobacterias, son regiones de 126 bp, altamente conservadas y localizadas en regiones no codificantes de los integrantes de la familia Enterobacteriaceae (Meacham y col., 2003). En el genoma de *E. coli*, existen entre 30 y 50 copias de la secuencia ERIC, las que presentan potenciales estructuras de anillo. Las unidades ERIC tienden a presentarse solas (Hulton y col., 1991). La secuencia palindrómica y la habilidad para formar un marco, son la clave para que los elementos ERIC presenten altos niveles de conservación (Yuan y col., 2010). Estos elementos se pueden amplificar, utilizando uno o más pares de cebadores diseñados en función de las zonas ERIC, con la finalidad de generar un patrón de bandas electroforético basado en la frecuencia y orientación de secuencias ERIC del genoma bacteriano. Este método de subtipificación genotípico, tiene la ventaja de ser práctico, simple, rápido y económico (da Silveira y col., 2002; Meacham y col., 2003; Leung y col., 2004; Wiczorek y col., 2004; Lu y col., 2005; da Costa y col., 2006; Namvar y col., 2006; Duan y col., 2009; Yuan y col., 2010). Para muchos microorganismos, este método posee un poder discriminatorio más alto que otros métodos de subtipificación (Meacham y col., 2003).

### **Combinadas**

**-AFLP** (*Amplified Fragment Length Polymorphism*). Este método está basado en la amplificación selectiva de fragmentos de ADN generados mediante digestión con enzimas de restricción (Hahm y col., 2003; Leung y col., 2004).

**-MLST** (*Multi-locus Sequence Typing*). Con este método se detectan las variaciones en las secuencias de aminoácidos de diferentes enzimas, mediante la secuenciación de ADN de genes seleccionados (generalmente *housekeeping*). Es un

método altamente reproducible y de alto poder discriminatorio (Spratt, 1999). Sin embargo, MLST no discrimina cepas con clonalidad altamente conservada, pero epidemiológicamente no relacionadas (Adiri y col., 2003; Ziebell y col., 2008; Miko y col., 2010).

**-MLVA** (*Multiple-locus variable number of tandem-repeats analysis*).

Esta técnica se está estudiando como una posible alternativa de MLST y PFGE. MLVA se basa en la amplificación y análisis del tamaño de los fragmento de regiones polimórficas de ADN que contienen un número variable de secuencias repetidas al azar (Lindstedt, 2005). Este método resultó muy útil para discriminar tipos de organismos altamente clonales. En la actualidad, el sistema de subtipificación MLVA se describió para *E. coli* genéricos (Lindstedt y col., 2007) y *E. coli* O157, O26 (Lindstedt y col., 2004; Miko y col., 2010). MLVA se utilizó con éxito, para el estudio retrospectivo de brotes y reservorios de cepas EHEC O157 y O103 de origen humano, animal y de alimentos (Murphy y col., 2008; Schimmer y col., 2008).

## 1.2.- Diarreas producidas por *E. coli* en cerdos

Las enfermedades diarreicas en los animales de granja y en el hombre, frecuentemente son producidas por alguno de los patotipos de *E. coli* (EPEC, ETEC, STEC, EHEC, EAEC, EIEC). De éstos, ETEC es una causa importante y global de diarrea acuosa y severa en la descendencia de algunas especies animales como terneros y lechones pre y posdestete (Nagy y Fekete, 2005).

Las infecciones por ETEC, se caracterizan por presentar cierta especificidad de especie, esto se debe a la presencia de receptores específicos en las células hospedadoras de una especie animal o en un número limitado de ellas. Por lo tanto, las cepas ETEC de origen animal no representarían una amenaza real al hombre no debiéndoselas considerar como zoonóticas, a diferencia de STEC o EHEC (Nagy y Fekete, 2005).

En la producción porcina, a partir del incremento de los sistemas de cría de tipo intensivos, las diarreas pasaron a tomar un lugar preponderante ya que ocasionan grandes pérdidas económicas. En los cerdos se pueden clasificar en tres grupos principales: diarrea neonatal (de 0 a 4 días de nacimiento), diarrea de los lechones (desde la primera semana de vida hasta finalizar la lactancia) y diarrea posdestete (Bertschinger y Fairbrother, 1999). *E. coli*, es la principal causa de diarrea neonatal y posdestete.

### 1.2.1 Diarrea neonatal

El patotipo de *E. coli* asociado con la diarrea neonatal del cerdo es ETEC. Este microorganismo se adhiere a la mucosa del intestino delgado a través de una o más adhesinas fimbriales F4, F5, F6 o F41. Una vez efectuada la colonización, comienza a producir las enterotoxinas STa, STb y/o LT. En principio, las cepas de ETEC comúnmente asociadas a casos de diarrea neonatal, pertenecían a los clásicos serogrupos O149, O8, O147 y O157, positivas a F4 y productoras de enterotoxinas LT y STb. Posteriormente, comenzaron a aislarse ETEC de los serogrupos O8, O9, O64 y O101, positivas a F5, F6 o

F41 y productoras de STa y menos frecuentemente STb. Estas cepas producen diarrea principalmente en lechones de 0 a 6 días de edad y en menor proporción en animales mayores, mientras que las F4 positivas a menudo son aisladas de cerdos diarreicos desde el nacimiento hasta la lactancia (Bertschinger y Fairbrother, 1999). La tabla 1 muestra los principales patotipos asociados con diarrea neonatal de lechones.

La colibacilosis entérica complicada con shock también puede presentarse en animales jóvenes, pre y posdestete. Las cepas de *E. coli* asociadas con esta enfermedad pueden ser: a) ETEC perteneciente a los serogrupos O149, O157 y O8, F4 positivas, productoras de toxinas STb y LT y sólo ocasionalmente productora de toxina Stx2e, o b) Productora de Stx2e y asociada a enfermedad de los edemas (Bertschinger y Fairbrother, 1999).

**Tabla 1. Principales patotipos de *Escherichia coli* asociados con diarrea neonatal en lechones**

Toxina(s)	Adhesinas fimbriales	Serogrupos O
STa	F5; F5+F41; F6; F6 + F41; F41; F5 + F6; F5+F6+F41	O8, O9, O20, O64, O101, O141
STa + STb	F4; F4+F5; F5+F6; F6; desconocidas	O20, O64, O141
LT + STb	F4; F4+F6	O8, O147, O149, O157
LT + STa + STb	F4; F4+F6	O8, O147, O149, O157
STb	F4; F6; desconocidas	O149

(Bertschinger y Fairbrother, 1999).

### 1.2.2 Diarrea posdestete y enfermedad de los edemas

A menudo, la diarrea posdestete por *E. coli* (DPD) y la enfermedad de los edemas (EE) se presentan en un mismo grupo productivo de animales y su manifestación, depende de la edad en la cual fueron destetados. Habitualmente, se presenta dentro de los 14 días posteriores al destete, aunque también se puede observar cuando los animales son trasladados a los corrales de engorde (Bertschinger y Fairbrother, 1999; Fairbrother y col., 2005).

Se caracteriza por diarrea acuosa, deshidratación, pérdida de peso y en algunos casos, ocasiona la muerte de los animales enfermos. Es de distribución mundial. Numerosos estudios demostraron que las cepas de *E. coli* productoras de la enfermedad pertenecen a un número limitado de serogrupos, entre ellos O138, O139 y O141. Cepas con estos serogrupos, también fueron aisladas de animales con EE. La distribución y frecuencia de los serogrupos pueden variar considerablemente de una región a otra, y en una misma región, en el transcurso del tiempo. *E. coli* productor de ambas enfermedades del destete, producen una toxina Shiga variedad 2e (Stx2e) y poseen el factor de colonización fimbrial F4 y F18. A partir de cerdos con diarrea, también se pudieron recuperar *E. coli* productores de toxinas LT o ST (ETEC). STEC (Stx2e), produce lesiones vasculares en el intestino, subcutáneo y cerebro, ocasionando diarrea o enfermedad de los edemas (Frydendahl, 2002; Zweifel y col., 2006).

Otra toxina termoestable que se encontró con alta prevalencia, en cepas ETEC aisladas a partir de humanos y animales con DPD, fue EAST1 (Bertin y col., 1998; Osek, 1999; Osek, 2000a; Choi y col., 2001; Frydendahl, 2002; Ngeleka y col., 2003; Noamani y col., 2003; Osek, 2003a). Se demostró que el 31,3 % de las cepas de *E. coli* aisladas a partir de lechones destetados con diarrea y/o enfermedad de los edemas y el 66 % de las cepas de *E. coli* productoras de citotoxinas factor necrotizante tipo I (CNF1) aisladas de bovinos

con diarrea o septicemia, transportan el gen para la toxina EAST1 (*astA*) (Bertin y col., 1998; Choi y col., 2001).

Independientemente a las adhesinas fimbriales F18 y F41, la diarrea porcina fue asociada a dos potenciales factores de virulencia de *E. coli*: la adhesina envuelta en la adherencia difusa (AIDA-I) y el factor porcino asociado a la adhesión-barrido (*paa*) (An y col., 1999; Ha y col., 2003; Ngeleka y col., 2003; Sherlock y col., 2004; Leclerc y col., 2007; Zhang y col., 2007; Ravi y col., 2007). Batisson y col. (2003), propusieron que es necesaria la presencia del factor Paa para el desarrollo de la lesión A/E por cepas EPEC de origen humano. Sin embargo, el significado del factor Paa en cepas ETEC asociadas a diarreas en cerdos es aún desconocido. Otro posible factor de virulencia en las *E. coli* productoras de DPD es el de adhesión y barrido (A/E) (An y col., 2000; Donnenberg y Whittam, 2001; Ngeleka y col., 2003). Sin embargo, ninguno de estos potenciales factores de virulencia fueron lo suficientemente caracterizados para involucrarlos en la diarrea porcina (Chapman y col., 1993; Ngeleka y col., 2003; Cheng y col., 2006).

AIDA-I, la forma madura de la adhesina, participa en el proceso de colonización de ciertas cepas ETEC. Se trata de una proteína de autotransporte distribuida sobre la membrana externa de las bacterias, responsable de la adhesión a los enterocitos que antecede a la colonización del intestino grueso, la auto-agregación previa a la formación de biofilm y el desarrollo de diarrea en lechones neonatos (Ravi y col., 2007). Los genes para AIDA-I fueron asociados con aislamientos F18<sup>+</sup>, y se demostró que la presencia de AIDA-I fue similar en aislamientos fimbriados y no fimbriados (24,8 % y 26,9 %, respectivamente). Sin embargo, la prevalencia del gen que codifica Paa fue diferente entre los aislamientos fimbriados y no fimbriados (60,0 % y 21,7 %, respectivamente). El gen *paa* estuvo presente en más de la mitad de las cepas F4<sup>+</sup>, mostrando una estrecha asociación con los genes que codifican para LT y STb.

**Tabla 2. Serogrupos de ETEC frecuentemente asociados a diarrea postdestete en cerdos**

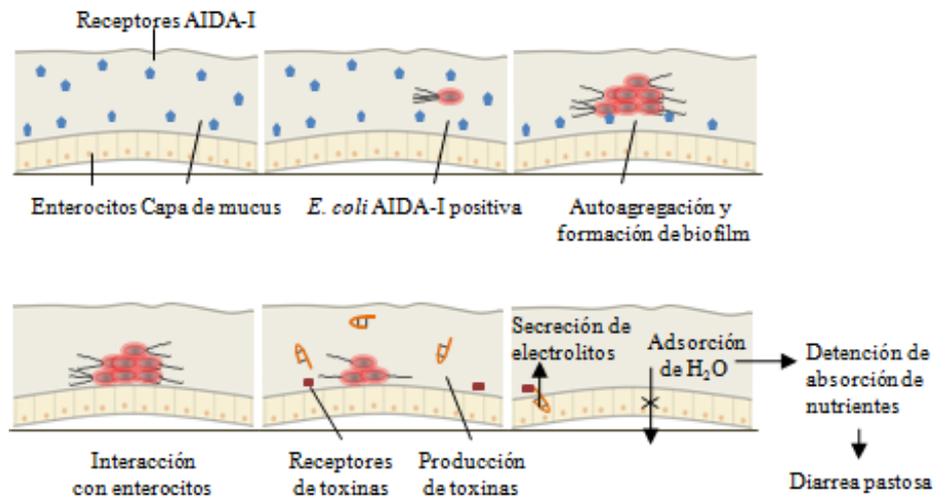
Serogrupo O	Antígenos fimbriales asociados	Antígenos H asociados	Observaciones
8	F4ab, F4ac	H19	
138	F18, F4ac*	H <sup>-</sup> , H4	A veces stx2e+
139	F18	H1	Asociado a ED
141	F18, F4ab, F4ac	H4	A veces stx2e+
147	F4ac, F18	H6, H19	A veces stx2e+
149	F4ac, F18*	H10, H19, H43, H <sup>-</sup>	Ocasionalmente stx2e+
157	F4ac	H19, H43	Ocasionalmente stx2e+

\*Infrecuente. ED: enfermedad de los edemas. (Fairbrother y col., 2005)

Se describió un subgrupo emergente de ETEC porcinos, negativos para los antígenos fimbriales clásicos (F4, F5, F6, F18 y F41) pero que expresan AIDA-I (Ngeleka y col., 2003). El gen que codifica AIDA-I se detectó en *E. coli* de lechones con DPD o con EE (Ha y col., 2003; Ngeleka y col., 2003, Dubreuil, 2010). Hasta el momento, el mecanismo por el cual se produce la inducción de la diarrea es desconocido. Sin embargo, se describió un nuevo virotipo de *E. coli* portador de STb y AIDA-I asociado a importantes diarreas (Ngeleka y col., 2003). La patofisiología observada no es típica de una enfermedad clásicamente asociada a ETEC con la colonización del intestino delgado y producción de diarrea acuosa. En contraposición, se observa una masiva colonización del intestino grueso con formación de biofilm, seguido por diarrea pastosa (Dubreuil, 2010). El linaje STb/AIDA-I podría haber sido, hasta el momento, el eslabón perdido en cuanto a información de la colibacilosis porcina. Por las similitudes observadas entre AIDA-I porcina y humana, podría representar un potencial riesgo de infección cruzada entre cerdos y humanos. Esa infección podría adquirirse como una zoonosis luego de que el hospedador disemine las bacterias (Dubreuil, 2010).

**Figura 11. Esquematzación del mecanismo por el cual producen diarrea *Escherichia coli* STb/AIDA-I**

AIDA-I, presente en una cepa de *E. coli*, reconoce sus receptores ubicados en el mucus y sobre la superficie de los enterocitos. Las bacterias se unen a su receptor con la consiguiente formación de



de autoagregación y biofilm. Posteriormente se establece una estrecha asociación entre la bacteria y el enterocito, lo que favorece, una vez comenzada la producción de toxinas, el reconocimiento y la unión a los receptores específicos de éstas últimas (en caso de toxina STb, sulfátidos). Como consecuencia de la actividad tóxica, se produce la liberación de electrolitos desde los enterocitos y la disminución de la absorción de agua. Por AIDA-I, se observó la disminución de la absorción de nutrientes y la producción de diarrea pastosa. Todo este proceso tiene lugar en la región proximal del colon (Dubreuil, 2010 adaptado por Martín Carriquiriborde).

### 1.3 Enfermedades Transmitidas por Alimentos

En el siglo XXI, las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) siguen constituyendo uno de los principales desafíos para la salud pública. El desarrollo de estrategias de prevención y control requiere un trabajo colaborativo entre el campo de la medicina humana y veterinaria, los organismos reguladores de la producción, la industria alimentaria, la vigilancia epidemiológica y el desarrollo de redes de laboratorios y de informática, y sobre todo la educación de la comunidad sobre seguridad alimentaria.

Las ETA se definen como un conjunto de síntomas y signos clásicos originados por el consumo de productos alimenticios e ingredientes, especias, bebidas y agua, que contienen agentes patógenos o sustancias tóxicas en cantidades tales que afectan la salud de una persona o grupo de personas en forma aguda o crónica.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), las ETA constituyen uno de los problemas de salud más relevantes, tanto en los países desarrollados, como en los países en vías de desarrollo. Cada año, la OMS recibe informes sobre la ocurrencia de cientos de casos de ETA en todo el mundo, siendo los más frecuentes los ocasionados por alimentos que sufrieron contaminación biológica.

Entre las bacterias asociadas a ETA se incluyen *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* y *Clostridium perfringens*. Sin embargo, en los últimos años se presentaron brotes ocasionados por patógenos emergentes y reemergentes que pusieron de manifiesto la fragilidad de los programas de protección de alimentos para prevenir y controlar las ETA. Esto aumentó los riesgos para la población y afectó el comercio nacional e internacional de alimentos.

Entre los patógenos bacterianos emergentes se destacan: *Salmonella* Enteritidis, *S. Typhimurium* fagotipo 104 (DT 104), *Escherichia coli* productor de toxina Shiga, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica*, *Shigella dysenteriae* y *Cronobacter sakazakii*, entre otros.

### 1.3.1 Situación actual de las ETA causadas por STEC

La notificación de las infecciones por STEC experimentó un aumento exponencial a partir de su primera descripción en 1982. Este comportamiento de patógeno emergente refleja, tanto un aumento real en el número de infecciones, como así también una mejora en los sistemas de vigilancia de las enfermedades asociadas y de los métodos de detección. Su emergencia generó una gran preocupación a nivel mundial por el número de personas afectadas y por los distintos vehículos de transmisión identificados (carnes, vegetales, alimentos ácidos, aguas de consumo y recreación, etc.), lo que llevó a la OMS a promover estrategias de prevención y control.

En Europa continental, las infecciones por cepas STEC no-O157 son más frecuentes, mientras que en Gran Bretaña STEC O157 aparece asociado a casos esporádicos y brotes, fundamentalmente por productos cárnicos. En Alemania, cepas de *E. coli* O157 son causa frecuente de casos esporádicos y brotes de diarrea y SUH. En Asia hay pocos reportes de infecciones por STEC O157, salvo en Japón a partir del brote masivo con más de 10.000 afectados en 1996, posiblemente por falta de sistemas de vigilancia. En Australia, las infecciones por STEC no-O157, fundamentalmente O111:NM, son más frecuentes que las de O157. En Canadá, la incidencia de las infecciones por *E. coli* O157:H7 es de 5,3 casos/100.000 habitantes, siendo la exposición a carne molida mal cocida, contacto directo con el ganado, agua de consumo contaminada y un medio ambiente rural contaminado los factores de riesgo más importantes.

En EEUU, las infecciones por *E. coli* O157:H7 continúan siendo un problema importante de salud a pesar de la implementación de sistemas de vigilancia de los patógenos asociados a las ETA y un estricto control de la producción de alimentos a partir del brote multi-estado ocurrido en 1993. Si bien se identificaron nuevos vehículos de transmisión como vegetales, jugos de manzana no pasteurizados, aguas de consumo y recreacionales, los productos a base de carne molida como las hamburguesas siguen

siendo la principal fuente de infección. El CDC estimó que STEC O157:H7 causa 73.000 casos de enfermedad anuales, mientras que STEC no-O157 causa al menos 37.000 enfermos por año, ocasionando más de 2.000 hospitalizaciones y 60 muertes por año en EEUU (Mead y Griffin, 1998).

En América del Norte, en función de los hallazgos observados en diferentes estudios, los cuales indican que los serotipos no-O157 serían la causa del 30 % al 50 % de enfermedad por STEC, el dominio del serogrupo O157:H7 está siendo cuestionado (Gill y Gill, 2010).

En América del Sur, existen diferencias importantes en la incidencia de infecciones por STEC y SUH. Aún no existe una red regional de vigilancia y sólo hay datos de unos pocos países. Los Laboratorios de Referencia Nacionales participan de una red regional llamada PulseNet América Latina y Caribe. Algunos países crearon Base de Datos Nacionales. SUH es endémico en algunos países del cono sur y es de declaración obligatoria en Argentina, Chile y Paraguay. Si comparamos la situación de SUH, la incidencia anual en Argentina es cinco veces mayor que en Chile, sin embargo, la magnitud del problema es desconocido en otros países (Guth y col., 2010).

En Paraguay, la declaración de SUH es obligatoria desde 2005. En los últimos dos años, se informaron quince casos. La incidencia anual fue de 0,6 casos cada 100.000 niños menores de 5 años. En la ciudad de Asunción, se establecieron tres sitios centinelas. Se creó una base de datos nacional con fines de vigilancia molecular, pero sólo unas pocas cepas O157 y no-O157 se aislaron a partir de casos de SUH y diarrea (Guth y col., 2010).

En Uruguay, la declaración de SUH no es obligatoria y sólo se reconocen unos pocos casos al año. En 2002, se declaró el primer caso de SUH asociado a STEC O157 (Guth y col., 2010).

En Chile, en 1999, se estableció el Sistema Nacional de Vigilancia obligando a todos los laboratorios clínicos a informar y enviar los aislamientos al Laboratorio de Referencia. En

los últimos dos años, se caracterizaron 96 cepas, siendo el serotipo predominante el O157:H7 con más del 60 % de los aislamientos y el genotipo *stx*<sub>2</sub> el que prevaleció (Guth y col., 2010).

En algunas regiones de Brasil, las infecciones por STEC son un problema importante dentro de la salud pública. En los últimos años, cepas STEC O157 y no O157, se recuperaron a partir de enfermedades humanas severas como diarrea sanguinolenta, anemia hemolítica y SUH, de alimentos y de animales. La prevalencia de STEC entre niños con diarrea aguda, varía dependiendo de la región en estudio, pero en general, la incidencia es relativamente baja (Guth y col., 2010).

En Argentina, el SUH pos-diarrea es endémico. En los últimos 10 años, se informan aproximadamente, 500 casos por año. La incidencia varía entre 7,8 y 17 casos cada 100.000 niños de menos de 5 años y la letalidad varía entre 2 y 5 %. Esta tasa, si la comparamos con países industrializados, es diez veces más alta. El 60 % de los casos argentinos de SUH se asociaron con STEC, siendo *E. coli* O157:H7, el serogrupo predominante (Guth y col., 2010).

Si bien las cepas de STEC están distribuidas por América del Sur, infectando humanos y animales y contaminando productos alimenticios, la magnitud del problema es particular de cada país (Guth y col., 2010).

### 1.3.2 Reservorios y vías de transmisión de STEC

En distintos países, entre los que se incluye a la Argentina, se realizaron numerosos estudios sobre la prevalencia de STEC que permitieron confirmar el rol del ganado vacuno como principal reservorio, aunque resulta difícil realizar comparaciones entre dichos estudios por las diferencias en las metodologías utilizadas y el muestreo (Ørskov y col., 1987; Wells y col., 1991; Beutin y col., 1993; Chapman y col., 1993; Parma y col., 2000b;

Meichtri y col., 2004; Masana y col., 2010; Masana y col., 2011). A diferencia de lo que ocurre con las infecciones causadas por otras cepas de *E. coli* enteropatógeno, aquellas asociadas a STEC poseen un carácter zoonótico demostrado. Aunque la mayoría de los animales son portadores asintomáticos de STEC, se reportaron casos de diarrea en terneros, perros y gatos (Abaas y col., 1989; Hammermueller y col., 1995; Silva de Paula y Marin, 2008). Los rumiantes en general, y el ganado vacuno en particular, son los principales reservorios de STEC. Sin embargo, en diferentes estudios de investigación se demostró que pueden encontrarse cepas de STEC en el tracto gastrointestinal de animales domésticos como ovejas, cabras, búfalos, cerdos, perros y gatos (Beutin y col., 1993; Caprioli y col., 2005; Bentancor y col., 2007). También pueden encontrarse STEC en animales de vida silvestre (Leotta y col., 2006).

Tanto el ganado de carne como el ganado lechero son portadores de STEC. La bacteria no es patógena para el ganado y la colonización es de menos de 2 meses de duración. Además, la portación fecal es más frecuente en el ganado joven (2 a 24 meses) que en el ganado adulto. Los animales engordados en sistemas de cría intensiva tienen una prevalencia de STEC tres veces superior a la observada en animales alimentados solo con pastura, probablemente debido a alteraciones de la microbiota normal, el pH y la concentración de ácidos grasos. La presencia en los *feedlot* de estas cepas se debe a la resistencia ácida de algunas cepas de STEC. Sobre un total de 59 animales engordados en un *feedlot* Padola y col., 2004 recuperaron 44 aislamientos de STEC, de los cuales 27 (45,8 %) fueron portadores de *stx*<sub>2</sub>, 3 (5,1 %) de *stx*<sub>1</sub> y 7 (11,9 %) de *stx*<sub>1</sub> y *stx*<sub>2</sub>. En el mismo estudio, se identificaron 10 serogrupos O diferentes (O2, O15, O25, O103, O145, O146, O157, O171, O174, O175) y 6 antígenos H (H2, H7, H8, H19, H21, H25). También se demostró que los animales de *feedlot* de Argentina pueden ser portadores de EHEC O145:H- (Padola y col., 2002). En un estudio realizado en nueve plantas de faena de Argentina, se obtuvo una prevalencia de STEC O157 de 4,1 % en muestras de materia fecal

y de 2,6 % en muestras de carcasa bovina, mientras que la prevalencia de STEC no-O157 fue de 22,3 % y 9 %, respectivamente (Masana y col., 2010; Masana y col., 2011). Se propuso que la utilización de granos para engordar rápidamente al ganado en sistemas de cría intensiva es un factor que favorece al patógeno. Sin embargo, la evidencia científica sobre la controversia entre la alimentación con granos o pastos no es concluyente (Hovde y col., 1999).

La principal vía de transmisión de STEC son los alimentos contaminados, como por ejemplo, carne molida, productos cárnicos crudos o insuficientemente cocidos, hamburguesas, embutidos fermentados, morcilla, leche no pasteurizada ni hervida, yogur, quesos, papas, lechuga, brotes de soja y rábano, jugos de manzana no pasteurizados, y agua, entre otros (Blanco y col., 2004; Kaper y col., 2004; Caprioli y col., 2005; Oteiza y col., 2006; Tanaro y col., 2010).

La contaminación de los alimentos se debe principalmente al contacto con las heces de los animales. El consumo de carne molida o hamburguesas mal cocidas es la principal causa de infección por STEC. Durante la faena se contamina la superficie de la res, y en el procesamiento se transfiere la contaminación bacteriana al interior de la carne, donde los microorganismos pueden resistir una cocción insuficiente. En Argentina, se detectó un 8,4 % de STEC no-O157 en hamburguesas congeladas (Gómez y col., 2002); un 6,8 % de STEC O157:H7 en hamburguesas crudas y cocidas (Chinen y col., 2001); y un 13,2 % de STEC en productos cárnicos a nivel de boca de expendio (Jure y col., 2010).

Otras formas de transmisión incluyen la contaminación cruzada durante la preparación de los alimentos, el contacto directo del hombre con los animales y persona a persona por la ruta fecal-oral. Es importante destacar que la dosis infectiva capaz de ocasionar enfermedad por parte de este grupo bacteriano es entre 10 y 100 bacterias.

### 1.3.3 El cerdo como reservorio de STEC

Se realizaron diferentes estudios para determinar la prevalencia de STEC en cerdos. En nuestro país, en un período de 5 años se aisló un 5 % de STEC y ETEC a partir de hisopados rectales de cerdos con diarrea. Aunque no se aislaron cepas toxigénicas, ni *E. coli* O157 en animales clínicamente sanos (Parma y col., 2000b). En Bélgica, se describió la presencia de STEC y *E. coli* O157 en materia fecal, hisopados rectales y muestras ambientales de granjas productoras de cerdos, en contenido cecal y en carcasas a nivel de frigoríficos. Sin embargo, en ningún caso los aislamientos poseían la combinación de factores de virulencia indicadores de patogenicidad (*stx*<sub>1</sub>, *stx*<sub>2</sub>, *eae* y *ehxA*), por lo cual fueron consideradas como cepas no patógenas para el hombre (Botteldoorn y col., 2003). En Chile, demostraron que la incidencia de STEC en cerdos puede llegar al 69 % (Borie y col., 1997; Ríos y col., 1999). En Italia se describió un 7,8 % de STEC en muestras fecales de cerdos sanos, (Caprioli y col., 1993). Mientras que en 2003, Bonardi y col., a partir del mismo tipo de muestras, recuperaron 2,7 % de cepas de *E. coli* O157 pero que no portaban los genes para producción de toxinas Shiga. En EEUU, en el marco del Sistema Nacional de Monitoreo de Salud Animal de Cerdos (*National Animal Health Monitoring System's Swine 2000 Study*), se postuló que los cerdos podrían ser un potencial reservorio de cepas STEC productoras de enfermedad en humanos (Fratamico y col., 2004). En dicho estudio, el 13,2 y 6,4 % de los aislamientos estudiados poseían los genes *stx*<sub>1</sub> y *stx*<sub>2</sub>, respectivamente. El 80 % de los aislamientos analizados presentaron el gen *stx*<sub>2e</sub>. En Noruega se reportó una baja prevalencia de O157:H7 a partir de muestras de cerdos (Johnsen y col., 2001). En Suiza, sobre un total de 630 muestras tomadas en frigorífico se aisló un 7,5 % de cepas O157 y un 22 % productoras de toxina Shiga. Si bien, algunas presentaban otros factores de virulencia como intimina, hemolisina, proteína esencial para la íntima adhesión y la formación de las lesiones A/E, proteína EAST1, ninguna de las cepas O157 eran productoras de toxina Shiga. La caracterización de los factores de virulencia reveló que la

mayoría de las cepas STEC habían perdido la combinación de genes a partir de los cuales se las relaciona con enfermedades severas en humanos (Kaufmann y col., 2006).

Cornick y Helgerson (2004), en un estudio experimental, determinaron que los cerdos no presentan resistencia innata a la colonización por O157:H7 y que bajo condiciones favorables podrían servir como reservorio.

Dean-Nystrom y col. (2003), en un estudio comparativo de patogenicidad en cerdos neonatos, entre *E. coli* O157 y *E. coli* no-O157 intimina negativa y productor de toxina Shiga, observaron que la ausencia de intimina, hemolisina o motilidad tienen poco impacto en el proceso de patogénesis de enfermedades sistémicas durante la infección por STEC. La diferencia más importante entre los cerdos inoculados con cepas STEC no-O157 y los inoculados con STEC O157 fue la ausencia de lesiones A/E intestinales.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo general

El objetivo del trabajo de tesis fue determinar la prevalencia de ETEC y STEC aisladas de cerdos sin manifestación clínica de diarrea, como instrumento para mejorar la sanidad animal en las piaras de la provincia de Buenos Aires y conocer la portación de cepas STEC patógenas para el ser humano.

Para ello nos planteamos estudiar centralmente dos aspectos: uno referido a conocer la prevalencia de ETEC en las distintas etapas de la producción porcina; y dos, conocer la portación de STEC.

Creemos que el conocimiento preciso de la prevalencia de ETEC y STEC en los sistemas de producción porcina, puede contribuir al diseño de estrategias de control y prevención viables destinadas a mejorar la sanidad en las piaras y de esta manera disminuir las pérdidas económicas ocasionadas por las diarreas de origen bacteriano. Asimismo, y desde el punto de vista de la salud pública, consideramos sumamente importante contribuir a esclarecer el rol de los cerdos como reservorio de STEC.

### 2.2 Objetivos particulares

- Estandarizar las técnicas de PCR destinadas a la detección y caracterización genotípica de los aislamientos de ETEC y STEC.
- Realizar estudios moleculares de tamizaje a partir de cultivos primarios de materia fecal de cerdos, con el fin de detectar la presencia de los genes de virulencia que caracterizan a ETEC y STEC.

- Aislar y caracterizar feno-genotípicamente las cepas de ETEC y STEC detectadas por PCR a partir de los cultivos primarios.
- Determinar la prevalencia de los serotipos de ETEC y STEC.
- Determinar la susceptibilidad antimicrobiana de los aislamientos de *E. coli* toxigénicos y O157 no toxigénicos.
- Analizar la diversidad genética de los aislamientos de *E. coli* toxigénicos y O157 no toxigénicos.
- Determinar la asociación entre la presencia de *E. coli* toxigénicos y O157 no toxigénicos con la edad de los animales.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

El trabajo de tesis se desarrolló en tres etapas:

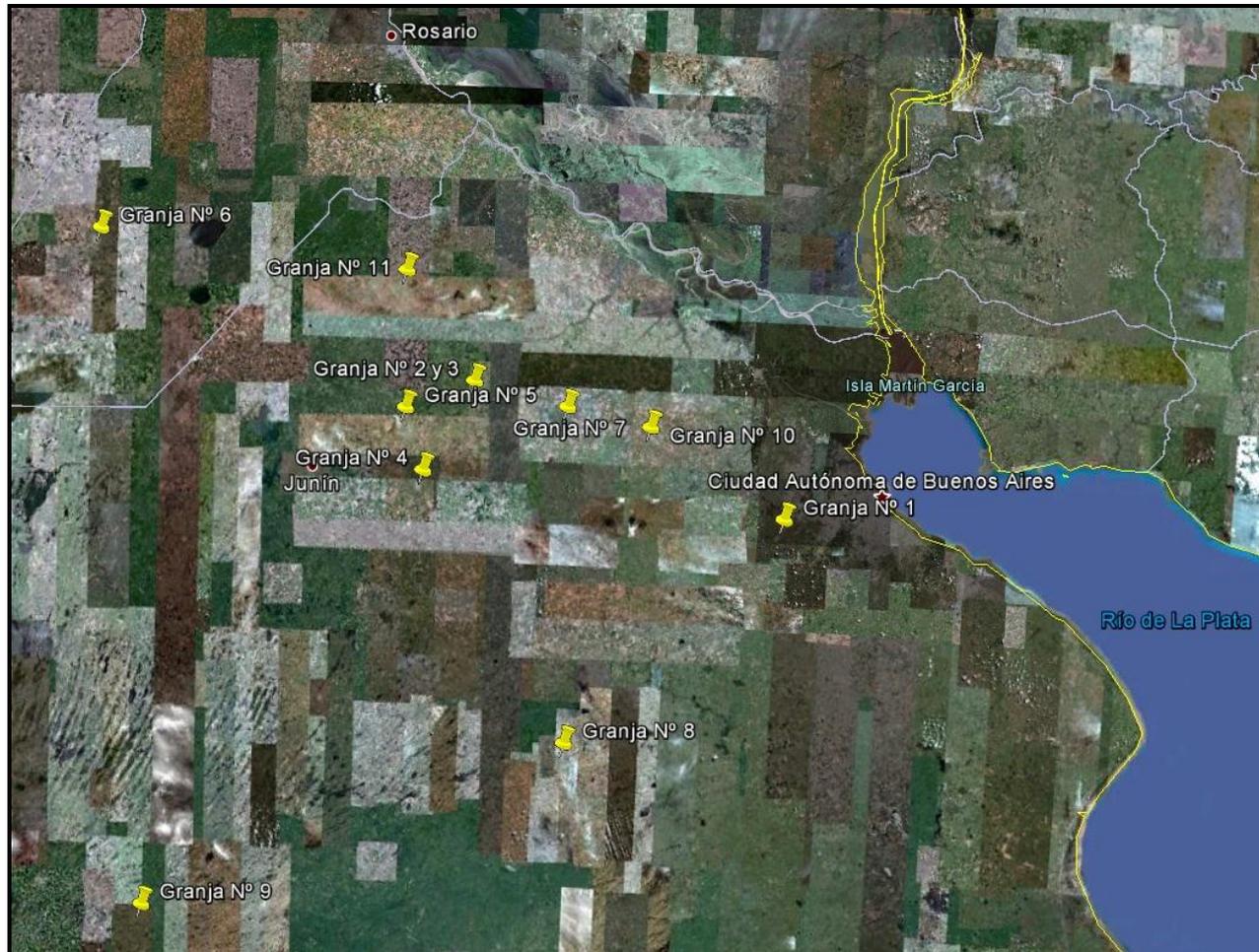
- 3.1. Toma de muestra, cultivos primarios y elaboración de ADN molde.
- 3.2. Detección de cerdos portadores de genes de virulencia mediante PCR.
- 3.3. Aislamiento, caracterización fenotípica, genotípica y subtipificación molecular de aislamientos de *E. coli* toxigénicos y *E. coli* O157 no toxigénicos.

#### **3.1. Toma de muestra, cultivos primarios y elaboración de ADN molde**

Entre los meses de abril y julio de 2007, se realizó un muestreo de tipo transversal en 11 establecimientos de producción porcina ubicados en el polo de producción porcina de Argentina: 10 se encontraban localizados en el norte de la provincia de Buenos Aires y uno en el sur de Santa Fé. Por motivos de confidencialidad, se enumeraron del 1 al 11. La fotografía satelital, indica la ubicación geográfica de los mismos (Imagen 8).

Las granjas seleccionadas para el muestreo, contaban con 235 madres (SD  $\pm$  111,48). Tenían implementado un sistema de cría intensiva en confinamiento. El manejo de la maternidad era “todo adentro-todo afuera” (TA-TF) y los destetes se realizaban a los 21 días de edad. Los sistemas de manejo en las etapas de recría, desarrollo y terminación variaban entre flujo continuo o TA-TF, dependiendo del establecimiento.

**Imagen 8. Ubicación geográfica de las granjas de producción porcina muestreadas**



**3.1.1. Toma de muestras:** en función de la edad, la población animal se dividió en tres grupos:

- a) M3, lechones de  $21 \pm 3$  días de vida (últimos días en maternidad)
- b) M6, animales de  $86 \pm 3$  días de vida
- c) M8, animales de  $165 \pm 3$  días de vida (días previos a la faena)

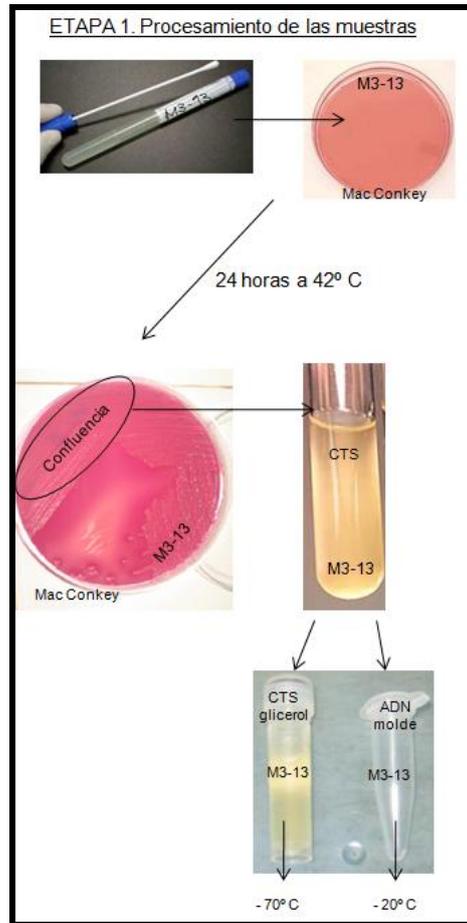
En una sólo visita por granja, se tomaron muestras de 30 animales/grupo/granja utilizando hisopados rectales (EUROTUBO® Collection swab. DELTALAB. España) (Meichtri y col., 2004). Los mismos se mantuvieron a 4° C, hasta su procesamiento, el que se realizó no más allá de las 24 horas. En total, se procesaron 990 hisopados rectales (90 muestras por granja).

La cantidad de animales a muestrear por grupo, se determinó asumiendo una prevalencia del *E. coli* toxigénicos del 50 % con un IC de 95 %.

**3.1.2. Cultivo primario:** los hisopados rectales se sembraron en agar Mac Conkey (Britania, Buenos Aires, Argentina) y se incubaron durante 24 horas a 37° C. Con intención de obtener una suspensión bacteriana uniforme, se repicó una ansada cargada de la primera estría de crecimiento confluyente en 3 ml de caldo tripticasa soya (CTS) (Britania). Esta sección del cultivo se eligió para la detección de los genes de virulencia, destacando la mayor sensibilidad que presenta para el análisis de un cultivo primario (Silva y col., 2002; Fratamico y col., 2004). Posteriormente, se tomaron 700 µl de esta suspensión y se colocaron en 300 µl de glicerol (Anedra, Buenos Aires, Argentina), conservándose a -70° C.

**3.1.3. Elaboración del ADN molde:** a partir de la confluencia homogeneizada, se tomó 1 ml, centrifugándose durante 5 minutos a 12.000 rpm. El sedimento se resuspendió con 150 µl en buffer Tritón X-100 al 1 % en buffer Tris-EDTA 1X (Ultra Pure™ Tris, Invitrogen, California, USA; EDTA, Bio-Rad Laboratories Inc, California, USA; Tritón® X-100, Promega, USA). Las muestras se colocaron en baño de agua hirviendo durante 15 minutos y se mantuvieron a - 20° C hasta su procesamiento, previa centrifugación durante 5 minutos a 12.000 rpm.

Figura 12. ETAPA 1: Procesamiento de las muestras



### 3.2 Detección de cerdos portadores de genes de virulencia característicos de ETEC, STEC y *Escherichia coli* O157

Para la detección de los cerdos portadores de ETEC, STEC y *E. coli* O157 se buscó por PCR en tiempo final, la presencia de los siguientes genes de virulencia: *eltA* (toxina termo lábil LT), *estI* (toxina termoestable STa), *stx<sub>1</sub>*, *stx<sub>2</sub>*, *stx<sub>2e</sub>* (*Stx<sub>1</sub>*, *Stx<sub>2</sub>* y *Stx<sub>2e</sub>*) y el gen *rfb<sub>O157</sub>*. Para la detección de genes característicos de ETEC se utilizó la PCR múltiple descrita por Toma y col. (2003). Los genes *rfb<sub>O157</sub>*, *stx<sub>1</sub>*, *stx<sub>2</sub>* se detectaron según la PCR múltiple validada por Leotta y col. (2005), y el gen *stx<sub>2e</sub>* según la PCR descrita por Blanco y col.

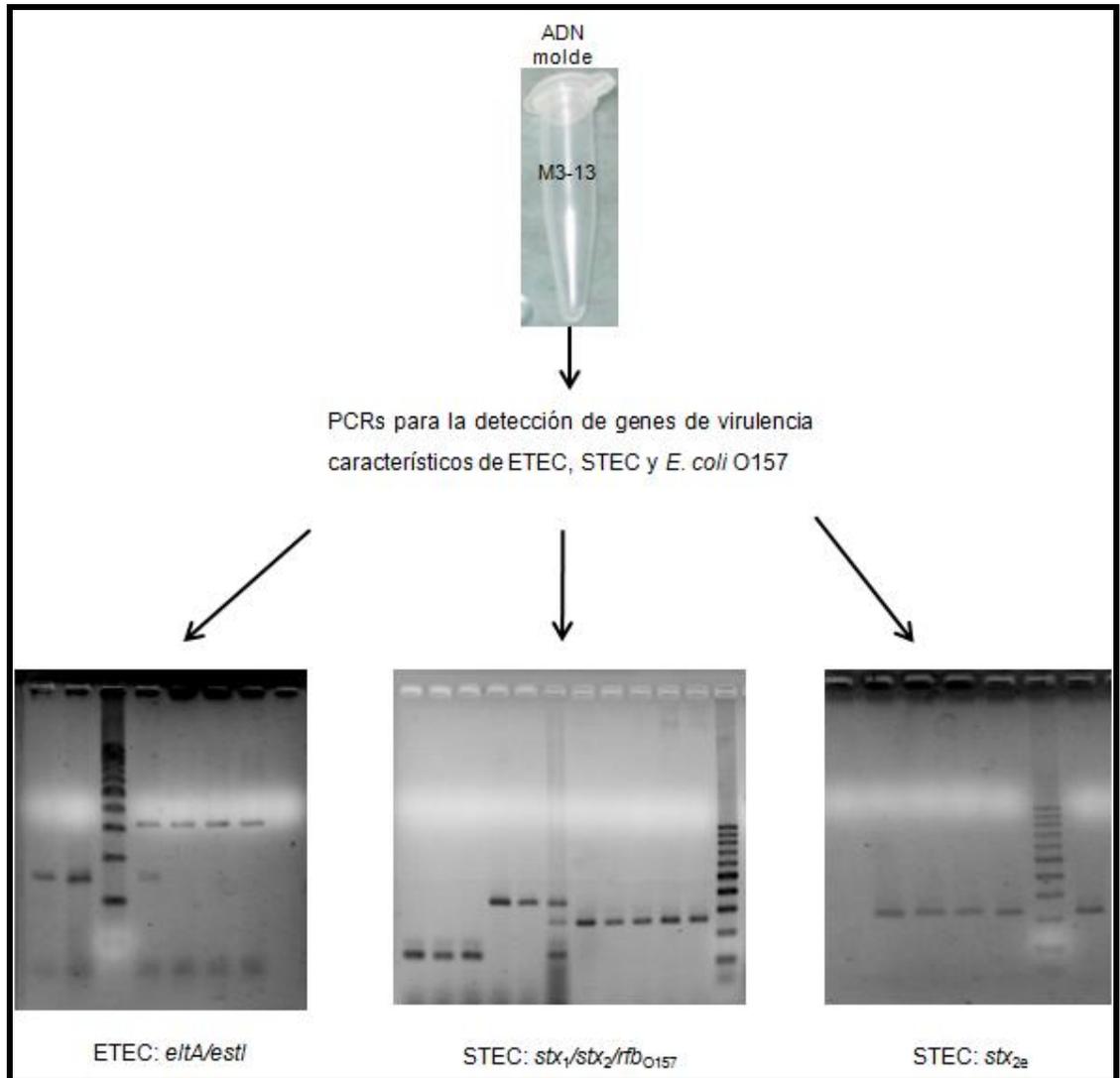
(1997). En la tabla 3 se describen las secuencias de los oligonucleótidos utilizados para la detección de cada gen y el tamaño de cada producto amplificado.

Para la preparación de la mezcla PCR se utilizó el Buffer PCR 10 X (Invitrogen Life Technologies, Brasil), mezcla de dNTPs (Invitrogen, California, USA), oligonucleótidos (Invitrogen, USA), *Taq* DNA polimerasa (Invitrogen, Brasil) y 2 µl de ADN molde. Las concentraciones utilizadas de cada reactivo se detallan en los protocolos descriptos en la sección ANEXO. Se utilizó un termociclador *My Cycler™ Thermal Cycler* (Bio-Rad, USA). La visualización de los productos amplificados se realizó sembrando 10 µl del producto PCR con 2 µl de una solución de xilene cyanol (Sigma, St. Louis, USA) 0,25 % y glicerol (Anedra, Buenos Aires, Argentina) en agua 30 %, en gel de agarosa (Biodynamics S.R.L., Buenos Aires, Argentina) al 2 % en buffer Tris Acetato EDTA (TAE) 1 X (Tris 0,48 %; ácido acético glacial 0,11 %, DORWK, Química Analítica, Argentina; 0,5 M EDTA pH 8 0,2 %) adicionado con 0,5 µg de bromuro de etidio/ml (Sigma, St. Louis, USA). La corrida electroforética se realizó durante 40 minutos a 100 V en una cuba ADVANCE Co., Ltd. (Tokio, Japón). Como marcador de peso molecular se utilizó CienMarker (Biodynamics). Para documentar los geles se utilizó un transiluminador Foto/UV<sup>®</sup>21 (Fotodyne, USA) y el sistema Foto/Analyst Express (Fotodyne).

**Tabla 3. Secuencia de los oligonucleótidos y tamaño de los productos amplificados utilizados para la detección de ETEC, STEC y *Escherichia coli* O157**

Gen	Cebadores	Secuencia de oligonucleótidos (5'-3')	Producto (bp)	Referencia
<i>estI</i>	AL65	TTAATAGCACCCCGGTACAAGCAGG	147	Tomá y col. 2003
	AL125	CCTGACTCTTCAAAAAGAGAAAATTAC		
<i>elt</i>	LTF	TCTCTATGTGCATACGGAGC	322	Tomá y col. 2003
	LTR	CCATACTGATTGCCGCAAT		
<i>rfb<sub>O157</sub></i>	O157F	CGGACATCCATGTGATATGG	259	Leotta y col. 2005
	O157R	TTGCCATGTACAGCTAATCC		
<i>stx<sub>1</sub></i>	Stx1a	GAAGAGTCCGTGGGATTACG	130	Leotta y col. 2005
	Stx1b	AGCGATGCAGCTATTAATAA		
<i>stx<sub>2</sub></i>	Stx2a	TTCACCACACCCACCCGGGCAGT	346	Leotta y col. 2005
	Stx2b	GCTCTGGATGCATCTCTGGT		
<i>stx<sub>2e</sub></i>	Stx2eA	CCTTAAC TAAAAAGGAATATA	230	Blanco y col. 1997
	Stx2eB	CTGGTGGTGTATGATTAAATA		

ETEC: *Escherichia coli* enterotoxigénico. STEC: *Escherichia coli* productor de toxina Shiga

**Figura 13. ETAPA 2: Detección de cerdos portadores de genes de virulencia**

**Análisis estadístico.** La prevalencia de ETEC, STEC y *E. coli* no toxigénico en los diferentes períodos de producción se calculó dividiendo la cantidad de muestras positivas para cada gen, por la cantidad total de muestras procesadas. Para determinar la posible asociación entre la presencia o ausencia de los distintos genes con respecto a la edad de los animales, se utilizó un análisis de regresión logística considerando la detección de cerdos portadores de los genes que caracterizan ETEC, STEC y *E. coli* O157, como

variable de respuesta y la edad de los animales y la granja a la cual pertenecían, como variables predictoras.

### **3.3 Aislamiento, caracterización fenotípica, genotípica y subtipificación molecular de los aislamientos de *Escherichia coli* toxigénicos y *Escherichia coli* O157 no toxigénicos**

**3.3.1 Metodología de recuperación de aislamientos de *Escherichia coli* portadores de genes de virulencia.** Para la recuperación de las cepas portadoras de los genes de virulencia detectados en la segunda etapa de la tesis doctoral, se organizó un esquema de trabajo distribuido en seis pasos:

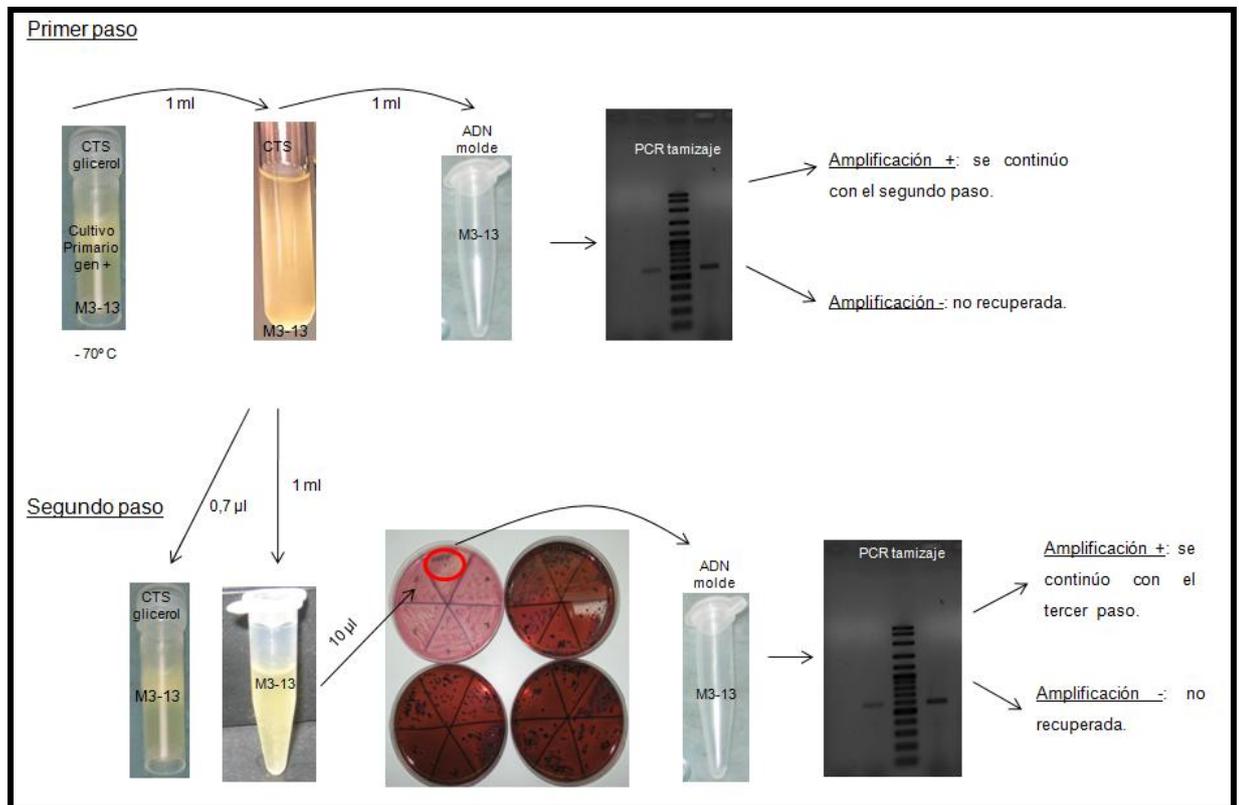
- Primer paso: se trabajó con los cultivos primarios conservados a  $-70^{\circ}$  C, con la intención de corroborar la presencia de las bacterias portadoras de los genes detectados en la Etapa 2 característicos de ETEC, STEC y *E. coli* O157 no toxigénico.
- Segundo paso: análisis de la confluencia resultante del repique desde el medio líquido al sólido.
- Tercer paso: análisis de *pooles* de colonias aisladas.
- Cuarto paso: análisis de sub-*pooles* de colonias aisladas.
- Quinto paso: detección de colonias portadoras de los genes buscados.
- Sexto paso: reisolamiento de la colonia portadora del gen detectado para su posterior caracterización fenotípica, genotípica y subtipificación molecular.

Primer paso: se sembró el volumen total de la suspensión bacteriana almacenada a - 70° C en 3 ml de CTS (Britania), incubándose a 42° C durante 24 horas. Posteriormente, a partir de 1 ml del cultivo en ATS, se realizó la extracción del ADN molde según lo descrito en la Etapa 1. Este primer paso concluyó con la realización de la PCR correspondiente. En caso de obtener la amplificación del gen buscado, se continuó con el siguiente paso. Los resultados negativos fueron considerados como “cepas no recuperadas”.

Segundo paso: en aquellos casos en los cuales se detectaron los genes buscados, se procedió al aislamiento de las cepas portadoras desde el medio líquido a medio sólido. Con la finalidad de concentrar la masa bacteriana, se centrifugó 1 ml del cultivo en CTS durante 15 minutos a 5000 rpm. Posteriormente, se colocaron 10 µl de sedimento en una placa de agar Mac Conkey y se realizó la siembra por agotamiento en la misma placa y en tres placas de EMB (Agar Eosina Azul de Metileno) (Britania). Se repitieron las condiciones de incubación previamente mencionadas. A partir de la estría inicial en agar Mac Conkey, se tomó una ansada y se colocó en 150 µl de buffer Tris-EDTA-Tritón 1X con la intención de preparar el ADN molde, realizándose nuevamente la PCR correspondiente. En caso de obtener la amplificación del gen buscado, se continuó con el siguiente paso. El resultado negativo fue considerado como “cepa no recuperada”.

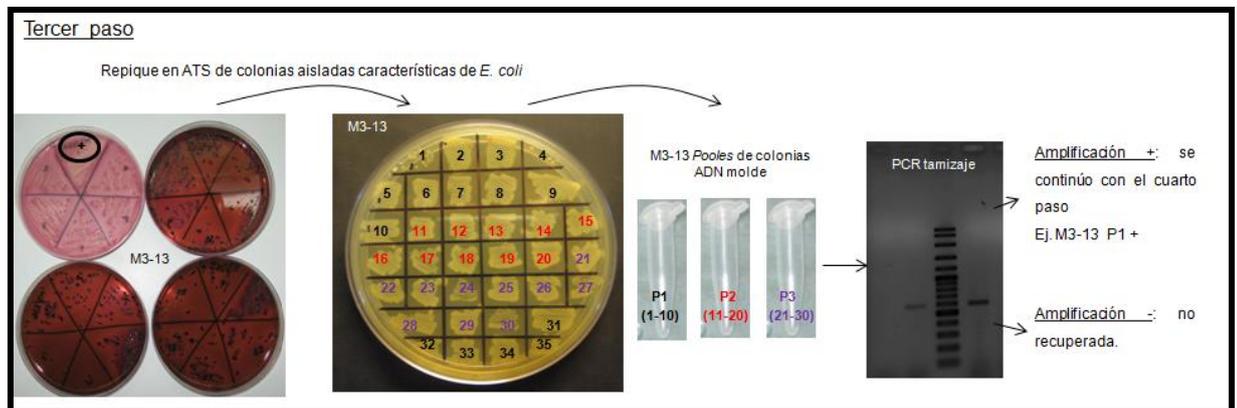
En este paso, se tomaron 700 µl del cultivo en CTS y se adicionaron 300 µl de glicerol conservándose nuevamente a - 70° C.

**Figura 14a. ETAPA 3: Aislamiento, caracterización fenotípica y genotípica, subtipificación molecular de *Escherichia coli* toxigénicos y *Escherichia coli* O157 no toxigénicos**



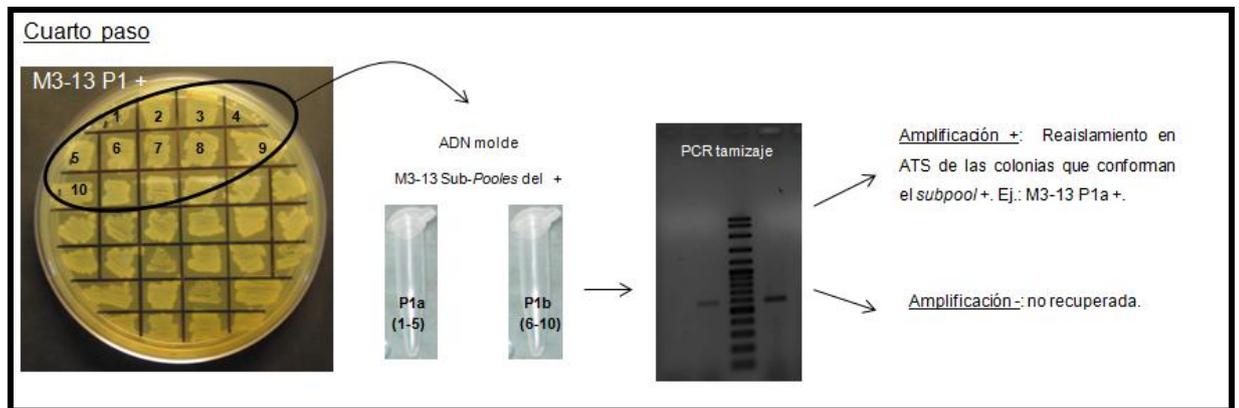
**Tercer paso:** análisis de *pooles* de colonias aisladas. De aquella confluencia positiva al o a los genes detectados, a partir de las placas de EMB, se repicaron en ATS 60 colonias características de *E. coli* (brillo verde metalizado). Se mantuvieron las mismas condiciones de incubación previamente descritas. El tercer paso, se produjo preparando los ADN moldes a partir de seis *pooles* de 10 colonias cada uno, realizándose nuevamente la PCR correspondiente. En caso de obtener la amplificación del gen buscado, se continuó con el siguiente paso. El resultado negativo fue considerado como "cepa no recuperada".

**Figura 14b. ETAPA 3: Aislamiento, caracterización fenotípica y genotípica, subtipificación molecular de *Escherichia coli* toxigénicos y *Escherichia coli* O157 no toxigénicos**



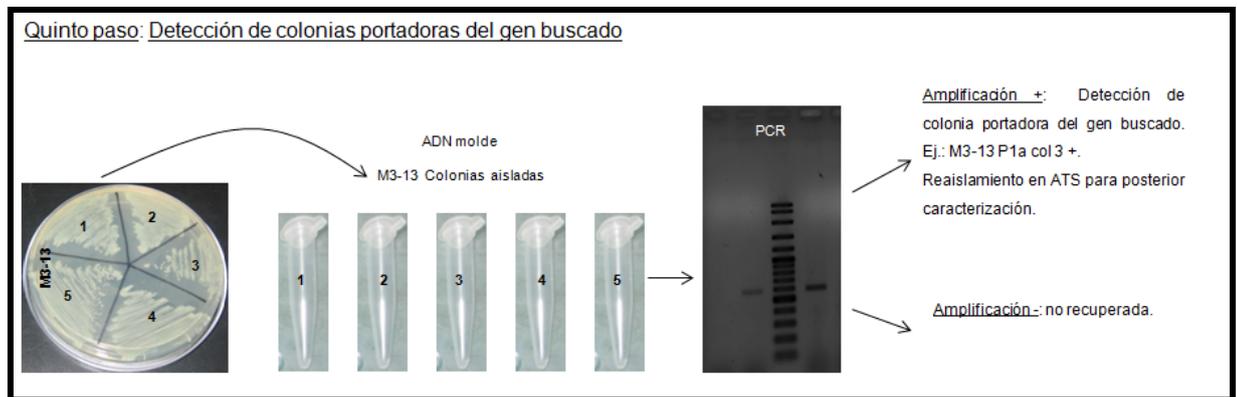
Cuarto paso: análisis de sub-*pools* de colonias aisladas. Se prepararon nuevos ADN moldes a partir de las colonias que conformaron el *pool* positivo al gen buscado. En este cuarto paso, los *pools* estuvieron conformados con 5 colonias. Se realizó nuevamente la PCR correspondiente. En caso de obtener la amplificación del gen buscado, se continuó con el siguiente paso. El resultado negativo fue considerado como “cepa no recuperada”.

**Figura 14c. ETAPA 3: Aislamiento, caracterización fenotípica y genotípica, subtipificación molecular de *Escherichia coli* toxigénicos y *Escherichia coli* O157 no toxigénicos**



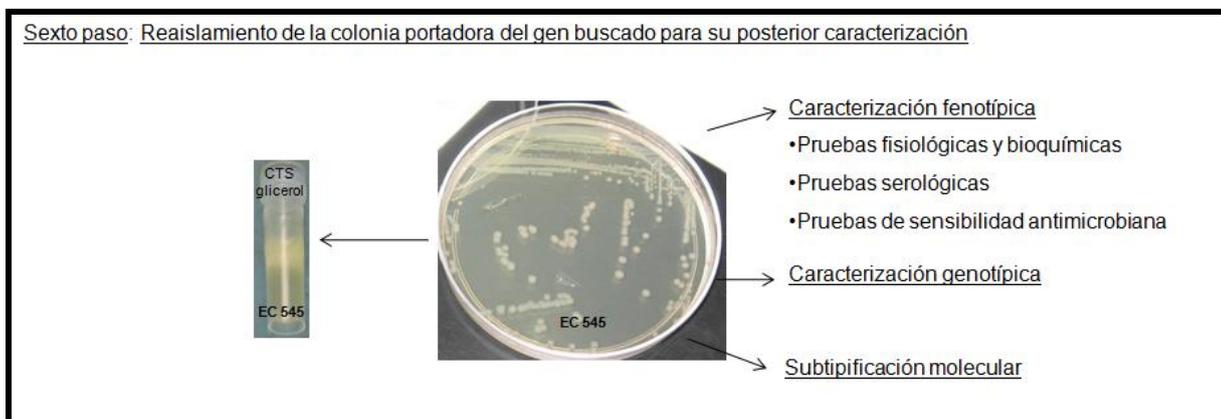
Quinto paso: detección de colonias portadoras de los genes buscados. Las colonias que conformaron el sub-*pool* en el cual se produjo la amplificación del gen buscado, se repicaron en ATS incubándose durante 24 horas a 37° C. Se realizaron los ADN moldes de cada una de las colonias individualmente, tomando una ansada de las mismas en 150 µl de buffer Tris-EDTA-Tritón 1X. Luego de colocarlas durante 15 minutos en baño de agua hirviente y centrifugarlas según lo anteriormente descrito, se realizó nuevamente la PCR correspondiente. En caso de obtener la amplificación del gen buscado, se continuó con el siguiente paso. El resultado negativo fue considerado como “cepa no recuperada”.

**Figura 14d. ETAPA 3: Aislamiento, caracterización fenotípica y genotípica, subtipificación molecular de *Escherichia coli* toxigénicos y *Escherichia coli* O157 no toxigénicos**



Sexto paso: re-aislamiento de la colonia portadora del gen detectado, para su posterior caracterización fenotípica, genotípica y subtipificación molecular. La colonia detectada como portadora del gen buscado se repicó en ATS y se incubó bajo las mismas condiciones descriptas en el quinto paso. A partir de una colonia aislada se continuó realizando la metodología correspondiente para el desarrollo de los pasos siguientes: conservación a  $-70^{\circ}\text{C}$  e ingreso al cepario, siembra de pruebas fisiológicas y bioquímicas, siembra en CTS para la realización de las pruebas de sensibilidad antimicrobiana y extracción de ADN, siembra en agar semiblando para las pruebas serológicas.

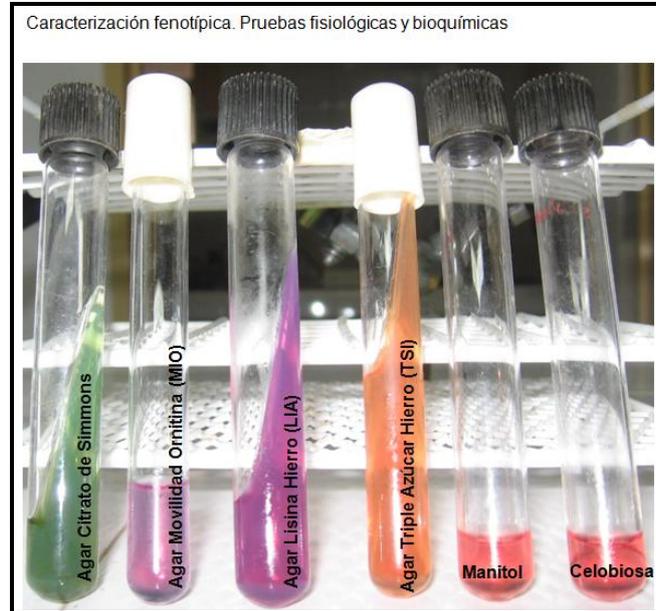
**Figura 14e. ETAPA 3: Aislamiento, caracterización fenotípica y genotípica, subtipificación molecular de *Escherichia coli* toxigénicos y *Escherichia coli* O157 no toxigénicos**



### 3.3.2 Caracterización fenotípica de los aislamientos de *Escherichia coli*

**3.3.2.1 Pruebas fisiológicas y bioquímicas.** Para caracterizar fenotípicamente las cepas de *E. coli* se utilizaron las siguientes pruebas fisiológicas y bioquímicas: fermentación de glucosa, lactosa y producción de ácido sulfhídrico (T.S.I. agar, Britania), utilización de citrato de sodio (agar citrato de Simmons, Britania), producción de lisina decarboxilasa (agar lisina hierro, Britania), fermentación de sorbitol, sacarosa y celobiosa (caldo rojo de fenol, Difco Laboratories, Detroit, USA; sorbitol, Anedra; celobiosa, MP Biomedicals, LL.C, Ohio, USA), producción de ornitina decarboxilasa (medio MIO, Difco, Becton Dickinson), producción de  $\beta$ -glucuronidasa e indol (Colibrít Test, Britania), producción de  $\beta$ -hemólisis (agar sangre base, Britania, adicionado con 5 % de sangre caprina desfibrinada).

**Imagen 9. Pruebas fisiológicas y bioquímicas utilizadas para la caracterización fenotípica de *Escherichia coli***



**3.3.2.2 Sensibilidad antimicrobiana.** Para la determinación de la sensibilidad antimicrobiana se utilizó la técnica de difusión en agar de acuerdo a las normas del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) documento M31-A3. Se evaluaron los siguientes antimicrobianos: ampicilina (10 µg) (Britania), cefalotina (30 µg) (Britania), cefotaxima (30 µg) (Britania), cefoxitina (30 µg) (Britania), amoxicilina/ácido clavulánico (20/10 µg) (Britania), gentamicina (10 µg) (Britania), amicacina (30 µg) (Britania), estreptomina (10 µg) (Oxoid), tetraciclina (30 µg) (Britania), ácido nalidíxico (30 µg) (Britania), ciprofloxacina (5 µg) (Britania), cloranfenicol (30 µg) (Britania), florfenicol (30 µg) (Britania para Laboratorio Cevasa), trimetoprima-sulfametoxazol (1,25/23,75 µg) (Britania), nitrofurantoína (300 µg) (Britania), fosfomicina (200 µg) (Britania para Laboratorio Bedson) y colistina (10 µg) (Oxoid). La interpretación de resultados se realizó según los puntos de corte indicados por los documentos M31-A3 y M100-S19. Se definieron como multirresistentes

aquellos aislamientos que presentaron resistencia a cuatro o más grupos de antimicrobianos. Se utilizó como cepa control *E. coli* 25922.

**3.3.2.3 Serotipificación.** La determinación del antígeno O se realizó mediante el método descrito por Guinée y col. (1981); modificado por Blanco y col. (1996). Se utilizaron todos los antisueros O disponibles (O1-O181). La determinación del antígeno H se realizó por la técnica de aglutinación en tubo, utilizando los antisueros H (H1-H56) (Ørskov y Ørskov, 1984). El kit completo de antisueros O y H se produjo en el Laboratorio de Referencia de *E. coli* (LREC, Lugo, España).

Para la serotipificación de los aislamientos ETEC, STEC y *E. coli* O157 no toxigénicos, se procedió de la siguiente manera. Se repicaron en ATS, e incubaron durante 24 horas a 37° C, las cepas aisladas y tipificadas fenotípica y genotípicamente, mantenidas a -70° C en glicerol al 30 %. A partir del desarrollo en ATS, se repicó una colonia aislada en agar semiblando (ATS, Britania; adicionado con Agar-Agar al 0,7 %, Britania). Luego de la incubación durante 24 horas a 37° C, las cepas se reservaron a 4° C hasta su procesamiento.

La serotipificación se realizó en el Laboratorio de Inmunoquímica y Biotecnología- Depto SAMP-FCV-UNCPBA, utilizando el siguiente protocolo:

#### Determinación del antígeno O

Los aislamientos se cultivaron en ATS a 37° C durante 18 horas. Posteriormente se suspendieron en 2 ml de solución salina, ajustándose la concentración bacteriana a  $1,8 \times 10^9$  UFC/ml, por comparación con el tubo N° 6 de la escala de Mc Farland. Se incubaron en baño de agua a 100° C durante 60 minutos. Una vez frío, se agregó a cada tubo 2 ml de solución salina formolada (0,5 % v/v) conteniendo violeta de genciana (0,005 %, p/v).

Para la determinación del seroagrupado orientativo, se efectuó una dilución 1/80 de los 9 antisueros polivalentes (A, G, H, I, J, K, M, N, O) en solución salina estéril con azida sódica. Posteriormente, se sembraron las placas enfrentando 50 µl de cada antisuero polivalente con 50 µl de cada aislamiento. A las 24 horas se realizó la lectura de las placas.

La formación de botón indicó que el aislamiento no fue reconocido por el o los antisueros en estudio. Cuando las bacterias permanecieron en suspensión en presencia de un antisuero, el resultado se consideró positivo, enfrentándose entonces a los sueros individuales que conforman el policlonal. Si un aislamiento fue reconocido por dos o más anticuerpos polivalentes, se efectuó la titulación para ver a cual correspondía, a efectos de hacer el seroagrupado definitivo.

Para la determinación del seroagrupado definitivo, se enfrentaron 50 µl de la suspensión bacteriana problema con 50 µl de cada uno de los antisueros monovalentes, en una dilución 1/80.

La formación de botón indicó que la cepa no fue reconocida por el o los antisueros monovalentes. Cuando las bacterias permanecieron en suspensión en presencia del suero monovalente, ese ensayo determinaba el serogrupo. Si un aislamiento fue reconocido por dos o más sueros monovalentes se efectuó la titulación para determinar el antígeno O definitivo.

#### Determinación del antígeno H

Se utilizó la técnica de aglutinación en tubo, utilizando los antisueros H (H1-H56) descrita por Ørskov y Ørskov (1984). Los antisueros se obtuvieron del *Statens Seruminstitut* (Copenhague, Dinamarca). Cuando de un mismo animal se aislaron varias cepas con igual serogrupo, la serotipificación se practicó en aquellas que diferían al menos en algún factor de virulencia.

Se estimuló la movilidad de cada cepa mediante 3 a 6 pasajes en Bacto Mil Medium (Difco, Becton Dickinson), en tubos U a 37° C durante 18 horas. Posteriormente, se sembró cada aislamiento en 8 ml de caldo cerebro corazón. Luego de 6 horas de incubación, se adicionó a cada tubo 8 ml de solución salina formolada al 0,5 % y se dejó en reposo 18 horas. Se prepararon los antisueros H diluyendo 1 µl en 200 µl en solución fisiológica. Posteriormente, se enfrentaron 200 µl de cada antisuero con 200 µl suspensión bacteriana inactivada. Se efectuó la lectura por precipitación, luego de incubar 2,5 horas a 45° C.

### 3.3.3 Caracterización genotípica de los aislamientos de *Escherichia coli*.

Para realizar la caracterización genotípica de los aislamientos identificados como ETEC, STEC y *E. coli* O157 no toxigénicos, se realizaron las PCR correspondientes con la finalidad de poner en evidencia la presencia de los genes que codifican los factores de colonización fimbriales: *faeG* (F4 o K88), *fedA* (F18), *fanC* (F5 o K91), *fasA* (F6) y *F41* (que codifica la expresión de la adhesina fimbrial); factores de colonización no fimbriales: *paa*, *eae* (intimina), *aidA*. Genes que codifican la producción de toxinas STb (*estII*) y EAST1 (*astA*).

Caracterización genotípica de STEC. Sumados a los genes citados en el párrafo anterior, la caracterización genotípica de STEC concluyó con la búsqueda de los genes *ehxA* (codifica la producción de una enterohemolisina) y *saa* (codifica una adhesina autoaglutinante).

Caracterización genotípica de *E. coli* O157 no toxigénicos y ETEC O157. Sumados a los genes citados en el párrafo precedente, la caracterización genotípica de *E. coli* O157 no toxigénicos y ETEC O157 concluyó con la búsqueda de los genes *ehxA*, *fliCH7* (antígeno flagelar H7) y *saa*. Este último gen sólo se buscó en aquellas cepas en las cuales no se determinó la presencia del gen *eae*.

En la tabla 4 se describen los oligonucleótidos utilizados para la detección de cada gen, así como el tamaño de los productos amplificados y los trabajos que se consideraron como referencia. Para la mezcla PCR se utilizó el Buffer PCR 10 X (Invitrogen), mezcla de dNTPs (Invitrogen), oligonucleótidos (Invitrogen), *Taq* DNA polimerasa (Invitrogen). Se utilizó el mismo equipamiento y procedimiento que en el punto 3.2.

Se utilizaron como cepas de referencia: *E. coli* ATCC 33965 (*eltA/estI*) y *E. coli* EDL933 (*eae/paa*) cepario propio. *E. coli* 7805 (*eltA/estI/estII/faeG/astA*), *E. coli* 81-603 A (*fasA*), *E. coli* 1073 B44 (*fanC/F41*) y *E. coli* 88-1199 (*fedA*) gentilmente provista por el Dr. Gustavo Zielinsky y *E. coli* LS77-1 I (*stx<sub>2e</sub>*) cedida por la Dra. Nora Lía Padola.

**Tabla 4. Secuencia de oligonucleótidos utilizados para caracterizar genotípicamente a ETEC, STEC y *Escherichia coli* O157 no toxigénicos**

Gen	Cebador	Secuencia de oligonucleótidos (5'-3')	Tamaño del producto (pb)	Referencia
<i>faeG</i>	F4-FW	GGTGATTTCAATGGTTCC	764	Chapman y col., 2006
	F4-RV	ATTGCTACGTTACAGGGAGCG		
<i>fliC</i>	F5-FW	TGGGACTACCAATGCTTCTG	450	Chapman y col., 2006
	F5-RV	TATCCACCATTAGACGGAGC		
<i>fasA</i>	F6-FW	TCTGCTCTTAAAGCTACTGG	333	Chapman y col., 2006
	F6-RV	AACTCCACCAGTTGTATCAG		
<i>fedA</i>	F18-FW	GTGAAAAGACTAGTTTATTTTC	510	Chapman y col., 2006
	F18-RV	CTTGTAAGTAAACCGCGTAAGC		
<i>F41</i>	F41-FW	GAGGGACTTTCATCTTTTAG	431	Chapman y col., 2006
	F41-RV	AGTCCATCCATTATAGGC		
<i>paa</i>	Paa-FW	ATGAGAAACATAATGGCAGG	350	Chapman y col., 2006
	Paa-RV	TCTGGTCAGGTCGTCATATAC		
<i>aidA</i>	AIDA-I-F	ACAGTATCATATGGAGCCA	585	Ngeleka y col., 2006
	AIDA-I-R	TGTGCCCCAGAACTATTA		
<i>eae</i>	EAE-FW	CCCGAATTCGGCACAAAGCATAAGC	864	Karch y col., 1993
	EAE-RV	CCGGATCCGTCTCGCCAGTATTCG		

**Tabla 4. Secuencia de oligonucleótidos utilizados para caracterizar genotípicamente a ETEC, STEC y *Escherichia coli* O157 no toxigénicos**

Gen	Cebador	Secuencia de oligonucleótidos (5'-3')	Tamaño del producto (pb)	Referencia
<i>saa</i>	SAAD-F	CGTGATGAACAGGCTATTGC	119	Panton y col., 2001
	SAAD-R	ATGGACATGCCTGTGGCAAC		
<i>e/hxA</i>	hlyA1	GGTGCAGCAGAAAAAGTTGTAG	1551	Schmidt y col., 1995
	hlyA4	TCTCGCCTGATAGTGTTTGGTA		
<i>fliCh7</i>	FLICH7-F	GCGCTGTCGAGTTCATATCGAGC	625	Gannon y col., 1997
	FLICH7-R	CAACGGTGACTTTATCGCCATTCC		
<i>e/hA</i>	LTA-1	GGGACAGATTATACCGTGC	696	Chapman y col., 2006
	LTA-2	CCGAAATTCTGTTATATATGTC		
<i>estI</i>	STa1	TCITTCCTCTCTTTAGTCAG	166	Chapman y col., 2006
	STa2	ACAGGCAGGATTACAACAAAG		
<i>estII</i>	STb1	ATCGCATTCITCTTGCATC	172	Chapman y col., 2006
	STb2	GGGGCCCAAAAGCATGCTCC		
<i>astA</i>	East11a	CCATCAACACAGTATATCCGA	111	Chapman y col., 2006
	East11b	GGTCGCGAGTGACGGCTTTGT		
<i>stx<sub>2a</sub></i>	Stx2eA	CCTTAACTAAAAAGGAATATA	230	Blanco y col., 1997
	Stx2eB	CTGGTGGTGATGATTAATA		

### 3.3.4 Subtipificación

Los métodos de subtipificación, fenotípicos y genotípicos, se utilizaron con la finalidad de establecer la relación epidemiológica de los microorganismos estudiados.

**3.3.4.1 Subtipificación fenotípica.** Para la subtipificación fenotípica se utilizaron pruebas fisiológicas y bioquímicas (biotipificación) y serotipificación.

**3.3.4.2 Subtipificación genotípica.** La subtipificación genotípica se realizó mediante la técnica de secuencias repetitivas intergénicas de consenso de las enterobacterias (ERIC-PCR).

Extracción de ADN. Para la obtención del ADN bacteriano total, las cepas caracterizadas feno-genotípicamente fueron descongeladas en ATS (Britania) y se incubaron durante 24 horas a 37° C. A partir de la placa de ATS se repicó una colonia aislada en 3 ml de CTS (Britania), incubándose bajo las mismas condiciones previamente descritas. Se centrifugó 1 ml del cultivo bacteriano durante 5 minutos a 10.000 rpm. Posteriormente, se descartó el sobrenadante y al sedimento se le adicionó 450 µl de buffer de lisis (400 µl de buffer TE; 40 µl de 10 % SDS, Wako Pure Chemical Industries LTD., Japón; 10 µl de proteinasa K, concentración stock 20 mg/ml, Promega, Wisconsin, USA) incubándose durante 2 horas a 37° C. La precipitación de proteínas se realizó con acetato de amonio 10M durante 5 minutos, obteniéndose una concentración final de 2,5M (en 450 µl de buffer de lisis, 150 µl de acetato de amonio 10M (Biopack, Buenos Aires, Argentina). Se realizó una nueva centrifugación durante 5 minutos a 14.000 rpm. Se recuperó el sobrenadante en un nuevo tubo tipo *ependorf*. La precipitación del ADN se realizó con etanol 100 % (Dorwil Química Analítica, Buenos Aires, Argentina) a - 20° C, concentración final de 2 volúmenes (ej.: 200 µl del sobrenadante, 400 µl de etanol 100 %). Se realizó una nueva centrifugación a 14.000

rpm durante 15 minutos. Se descartó el sobrenadante. El sedimento se lavó con 500 µl de etanol 70 % y se centrifugó a la misma velocidad durante 5 minutos. Se descartó nuevamente el sobrenadante y el sedimento se secó, invirtiendo el tubo sobre un papel absorbente durante 20 minutos. Finalmente el ADN se resuspendió con 100 µl de TE, incubándose a 37° C durante 24 horas.

ERIC-PCR. Se realizó según el protocolo descrito por Amonsin y col. (2002), modificado por Leotta y col. (2006). Los oligonucleótidos utilizados para generar los perfiles de ADN fueron: ERIC1 (5' ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC 3') y ERIC2 (5' AAGTAAGTGAC TGGGGTGAGCG 3') (Biodynamics, Florida, EEUU) (Versalovic y col., 1991). Para la mezcla PCR se utilizó el Reactivo Buffer 5 X, suministrado con la enzima GoTaq, (Biodynamics) 1 X, mezcla de dNTPs (Invitrogen) 0,2 mM, MgCl<sub>2</sub> 3,5 mM, oligonucleótidos (Invitrogen) 1 pmol/µl, GoTaq DNA polimerasa (Biodynamics) 2,5 U. La amplificación se realizó en un termociclador *My Cycler™ Thermal Cycler* (Bio-Rad, USA) con una desnaturalización inicial a 95° C durante 5 minutos, seguida de 35 ciclos (desnaturalización 94° C durante 30 segundos, pegado de cebadores a 40° C durante 3 minutos y extensión a 72° C durante 2 minutos. Finalmente un periodo único de extensión a 72° C durante 7 minutos. La visualización de los productos amplificados se realizó sembrando 10 µl del producto PCR directamente en la agarosa (Biodynamics) al 2 % sumergida en buffer TAE 1 X, adicionado con 0,5 µg de bromuro de etidio/ml (Sigma). El Reactivo Buffer 5 X utilizado, contiene dos colorantes, azul y amarillo, y una sustancia que incrementa la densidad de la mezcla. Según los fabricantes, el colorante azul migra conjuntamente con los fragmentos de tamaño aproximado a 3 – 5 kb, mientras que el amarillo lo hace con los fragmentos menores a 50 pb. La corrida se realizó durante 55 minutos a 80 V en una cuba electroforética *BIO-RAD Wide mini-subcell GT* con una fuente de poder *BIORAD PowerPac Basic* (BIORAD). Como marcador de peso molecular se utilizó Cien Marker (Biodynamics). Para documentar los geles se utilizó un transiluminador *Benchtop Variable Transilluminator* (Upland, CA, USA) y

el sistema de adquisición de imágenes *Life Sciences Software from UVP DOC-It®LS Image Acquisition Software* (Upland, CA, USA).

Los perfiles moleculares obtenidos se analizaron con el *software* Quantity One 4.6.1 (BIORAD). La relación entre los perfiles se estimó por la proporción de bandas compartidas utilizando el programa TREECON para Windows y se generaron dendogramas basados en el método *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean* (UPGMA) (Van de Peer y De Wachter, 1994).

**Poder discriminatorio.** El poder discriminatorio (D) de las técnicas de subtipificación, se determinó mediante el índice de Simpson, según la siguiente fórmula (Hunter y Gaston, 1988):

$$\text{Índice de Simpson} \quad D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^s x_j(x_j-1)$$

N: número total de aislamiento estudiados

x<sub>j</sub>: número de aislamientos en el tipo j

s: número de tipos diferentes

## 4. RESULTADOS

La expresión de los resultados del trabajo de tesis doctoral está organizada en etapas, de la misma manera que en la sección Materiales y Métodos.

### **Etapa 1: Toma de muestras, cultivos primarios y elaboración de ADN molde**

De las 990 muestras procesadas, se observó desarrollo bacteriano en 986 (99,6 %).

Discriminando los resultados por grupos, M3 (21 ± 3 días de vida): 328 muestras

M6 (86 ± 3 días de vida): 328 muestras

M8 (165 ± 3 días de vida): 330 muestras

### **Etapa 2: Detección de cerdos portadores de genes de virulencia característicos de ETEC, STEC y *Escherichia coli* O157 no toxigénicos**

#### **4.1 Prevalencia de ETEC, STEC y *Escherichia coli* O157 no toxigénicos**

En el presente estudio se detectaron 353 (35,8 %) cerdos portadores de, al menos, un gen marcador de virulencia, característico de STEC (*stx*<sub>1</sub>, *stx*<sub>2</sub>, *stx*<sub>2e</sub>), ETEC (*eltA* y *estI*) o *E. coli* O157 (*rfb*<sub>O157</sub>). El 17 % (56/328) se detectó en el grupo M3, el 67 % (220/328) en M6 y el 23,3 % (77/330) en M8. Aquellos animales portadores de los genes *eltA* y *estI* solos o combinados con *stx*<sub>2e</sub> o *rfb*<sub>O157</sub> se incluyeron dentro del grupo ETEC. Los animales que portaron únicamente del gen *rfb*<sub>O157</sub> fueron considerados portadores de *E. coli* O157 no toxigénico.

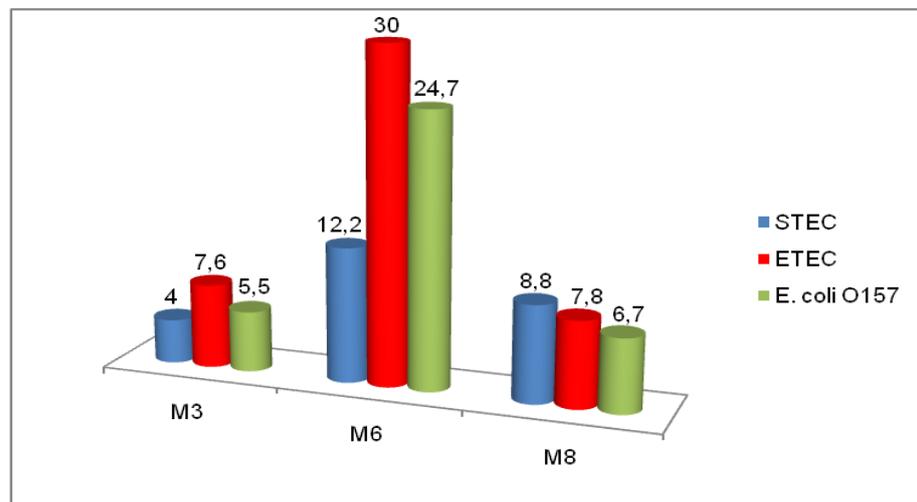
Se detectaron STEC, ETEC y *E. coli* O157 no toxigénicos en 8,3 % (82/986), 15,2 % (150/986) y 12,3 % (121/986) de las muestras, respectivamente. La tabla 5 detalla la prevalencia de cada categoría detectada en los diferentes grupos de cerdos.

**Tabla 5. Prevalencia de ETEC, STEC y *Escherichia coli* O157 no toxigénicos, en cerdos sin manifestación clínica de diarrea**

Categoría	M3 (21 ± 3 días de vida)	M6 (86 ± 3 días de vida)	M8 (165 ± 3 días de vida)	Prevalencia
STEC	13/328 (4 %)	40/328 (12,2 %)	29/330 (8,8 %)	82/986 (8,3 %)
ETEC	25/328 (7,6 %)	99/328 (30 %)	26/330 (7,8 %)	150/986 (15,2 %)
<i>E. coli</i> O157	18/328 (5,5 %)	81/328 (24,7 %)	22/330 (6,7 %)	121/986 (12,3 %)

STEC: *Escherichia coli* productor de toxina Shiga. ETEC: *Escherichia coli* enterotoxigénico. M3: 21 ± 3 días de vida; M6: 86 ± 3 días de vida; M8: 165 ± 3 días de vida

**Figura 15. Distribución de la prevalencia de cerdos portadores de ETEC, STEC y *Escherichia coli* O157 en función de la etapa productiva**



STEC: *Escherichia coli* productor de toxina Shiga. ETEC: *Escherichia coli* enterotoxigénico. M3: 21 ± 3 días de vida; M6: 86 ± 3 días de vida; M8: 165 ± 3 días de vida

Con respecto a la prevalencia de los genes detectados, el comportamiento fue el siguiente:

- los genes *stx*<sub>1</sub> y *stx*<sub>2</sub> sólo se detectaron en 13 lechones de 21 días de vida (M3), 1 % (10/986) y 0,3 % (3/986), respectivamente. No se detectaron en los grupos M6 y M8.
- no se observó la combinación entre los genes *stx*<sub>1</sub> y *stx*<sub>2</sub> con *rfb*<sub>O157</sub>
- el gen *stx*<sub>2e</sub> se detectó en 69 (7 %) cerdos de los grupos M6 (86 días de vida) y M8 (165 días de vida), sólo o conjuntamente con otros genes.

En el presente estudio, no se detectaron combinaciones entre los genes *stx*.

- los genes *eltA*, *estI* y la combinación entre ambos, se detectaron en 17 (1,6 %), 124 (12,6 %) y 9 (0,9 %) de los cerdos, respectivamente. A diferencia de lo observado con los genes *stx*, estos se detectaron en los tres grupos de animales: M3, M6 y M8. La prevalencia de *eltA* y la combinación *eltA/estI* fue muy parecida en los grupos M3, M6 y M8 (tabla 7). No ocurrió lo mismo con el gen *estI*, observándose un incremento de la prevalencia en M6 (4,3 %; 28 % y 5,4 %).

En la tabla 6 se detalla la prevalencia de los genes *stx* detectados en los diferentes grupos de animales. En la figura 16 se grafican estos datos.

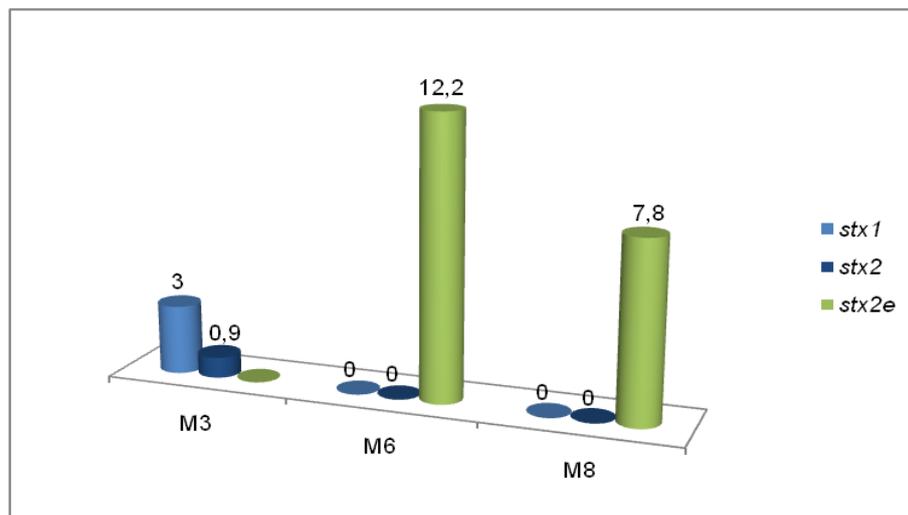
En la tabla 7 se describe la prevalencia de los genes *eltA* y *estI*, en la tabla 8 la prevalencia de estos genes discriminando según si fueron detectados solos o combinados. En la figura 17 se grafican los datos previamente mencionados.

**Tabla 6. Prevalencia de genes *stx*<sub>1</sub>, *stx*<sub>2</sub>, *stx*<sub>2e</sub> y *stx*<sub>2e</sub>/*rfb*<sub>O157</sub> en cerdos sin manifestación clínica de diarrea**

Genes	M3 (21 ± 3 días de vida)	M6 (86 ± 3 días de vida)	M8 (165 ± 3 días de vida)	Prevalencia
<i>stx</i> <sub>1</sub>	10/328 (3 %)	-	-	10/986 (1 %)
<i>stx</i> <sub>2</sub>	3/328 (0,9 %)	-	-	3/986 (0,3 %)
<i>stx</i> <sub>2e</sub>	-	40/328 (12,2 %)	29/330 (7,8 %)	69/986 (7 %)

M3: 21 ± 3 días de vida; M6: 86 ± 3 días de vida; M8: 165 ± 3 días de vida

**Figura 16. Prevalencia de genes *stx*<sub>1</sub>, *stx*<sub>2</sub> y *stx*<sub>2e</sub> en cerdos sin manifestación clínica de diarrea discriminada según la etapa productiva**

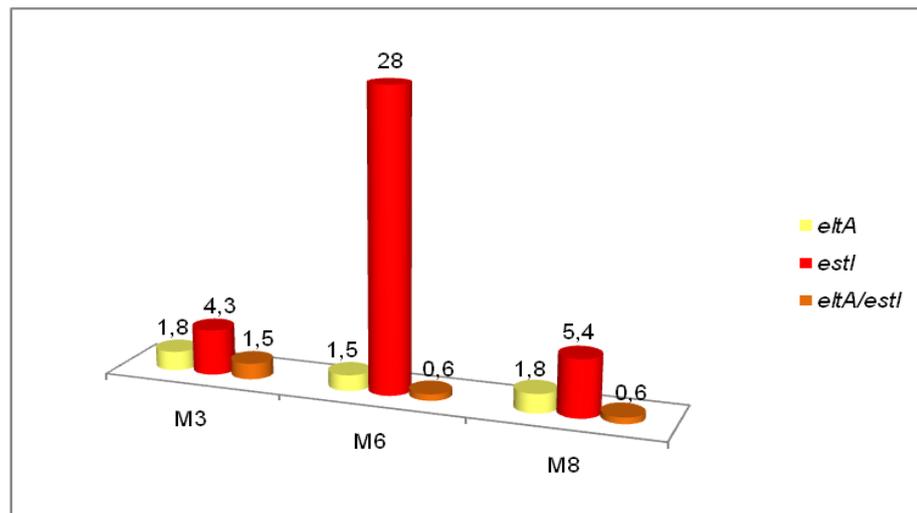


M3: 21 ± 3 días de vida; M6: 86 ± 3 días de vida; M8: 165 ± 3 días de vida

**Tabla 7. Prevalencia de *eltA* y *estI* detectados en cerdos sin manifestación clínica de diarrea**

Genes	M3 (21 ± 3 días de vida)	M6 (86 ± 3 días de vida)	M8 (165 ± 3 días de vida)	Prevalencia
<i>eltA</i>	6/328 (1,8 %)	5/328 (1,5 %)	6/330 (1,8 %)	17/986 (1,6 %)
<i>estI</i>	14/328 (4,3 %)	92/328 (28 %)	18/330 (5,4 %)	124/986 (12,6 %)
<i>eltA/estI</i>	5/328 (1,5 %)	2/328 (0,6 %)	2/330 (0,6 %)	9/986 (0,9 %)

**Figura 17. Prevalencia de genes *eltA* y *estI* en cerdos sin manifestación clínica de diarrea discriminada según la etapa productiva**



M3: 21 ± 3 días de vida; M6: 86 ± 3 días de vida; M8: 165 ± 3 días de vida

Los genes *stx*<sub>1</sub> y *stx*<sub>2</sub> (incluyendo su variante *stx*<sub>2e</sub>) se detectaron en 4 granjas (36,6 %) y 10 (91 %) de las granjas, respectivamente. Los tres animales portadores del gen *stx*<sub>2</sub> se detectaron en una sola granja. En ninguna de las granjas muestreadas se detectó el gen

*stx<sub>2e</sub>* en la categoría M3, siendo 7 de 11 (63,6 %) y 6 de 11 (54,4 %) positivas para este gen en M6 y M8, respectivamente.

En el total de las granjas analizadas se detectó el gen *rfb<sub>O157</sub>*, en 7/11 (63,6 %), 10/11 (90,9 %) y 4/11 (6,4 %) en M3, M6 y M8, respectivamente. No se detectaron combinaciones entre los genes *stx<sub>1</sub>*, *stx<sub>2</sub>* y *rfb<sub>O157</sub>*. En 5 (45,4 %) de las granjas se detectaron animales portadores de la combinación de genes *rfb<sub>O157</sub>/stx<sub>2e</sub>*.

El gen *estI* se detectó en las 11 granjas de producción porcina analizadas, 6/11 (54,4 %), 10/11 (90,1 %) y 5/11 (45,4 %) de las granjas en las categorías M3, M6 y M8, respectivamente.

El gen *eltA* se detectó en 8 (72,7 %) de las 11 granjas de producción porcina analizadas. En 5/11 (45,4 %); 3/11 (27,3 %) y 4/11 (36,4 %) de las granjas en las categorías M3, M6 y M8, respectivamente.

**Tabla 8. Prevalencia de *eltA* y *estI* solos o combinados con otros genes detectados en cerdos sin manifestación clínica de diarrea**

Genes	M3	M6	M8	Prevalencia
	(21 ± 3 días de vida)	(86 ± 3 días de vida)	(165 ± 3 días de vida)	
<i>eltA</i>	5/328 (1,5 %)	4/328 (1,2 %)	3/330 (0,9 %)	12/986 (1,2 %)
<i>estI</i>	14/328 (4,3 %)	41/328 (12,5 %)	14/330 (4,2 %)	69/986 (7 %)
<i>eltA/estI</i>	5/328 (1,5 %)	2/328 (0,6 %)	-	7/986 (0,7 %)
<i>estI/rfb<sub>O157</sub></i>	-	26/328 (7,9 %)	3/330 (0,9 %)	29/986 (2,9 %)
<i>eltA/estI/rfb<sub>O157</sub></i>	-	-	1/330 (0,3 %)	1/986 (0,1 %)
<i>eltA/rfb<sub>O157</sub></i>	1/328 (0,3 %)	-	-	1/986 (0,1 %)
<i>estI/stx<sub>2e</sub></i>	-	13/328 (4 %)	-	13/986 (1,3 %)
<i>estI/rfb<sub>O157</sub>/stx<sub>2e</sub></i>	-	8/328 (2,4 %)	3/328 (0,9 %)	11/986 (1,1 %)
<i>eltA/stx<sub>2e</sub></i>	-	1/328 (0,3 %)	3/328 (0,9 %)	4/986 (0,4 %)
<i>eltA/estI/stx<sub>2e</sub></i>	-	-	1/328 (0,3 %)	1/986 (0,1 %)

#### 4.2 Asociación entre la presencia de los distintos genes con los grupos de animales según la edad de vida.

Para estimar la probabilidad del hallazgo de individuos positivos a los distintos genes, se calculó el valor de *odds ratio* (OR) para cada gen, con anidamiento de granja en cada grupo, según la edad (M3, M6 y M8). En la tabla 9 se muestran los resultados correspondientes.

El comportamiento de la probabilidad para de detectar los genes *eltA* y *estI*, no fue similar. Con respecto a *estI*, M6 mostró ser el grupo en el cuál se observaron valores OR con intervalo de confianza de relevancia y estadísticamente significativos. Debe aclararse, que además se detectó una situación dispar entre las granjas, aunque no fue así para los grupos M3 y M8. Para el gen *eltA*, la probabilidad de detectar cerdos positivos fue tan baja que no puede ser determinada con exactitud y precisión.

Los valores OR para la detección de cada uno de los genes que caracterizan STEC (*stx<sub>1</sub>*, *stx<sub>2</sub>* y *stx<sub>2e</sub>*), al igual de lo que ocurrió con ETEC, fueron distintos. Con respecto a los genes *stx<sub>1</sub>* y *stx<sub>2</sub>* la probabilidad de detectar cerdos positivos fue tan baja que no puede ser determinada con exactitud y precisión. Para *stx<sub>2e</sub>*, M6 mostró ser el grupo en el cuál se observaron valores OR con intervalo de confianza de relevancia y estadísticamente significativos. Debe aclararse, que además se detectó una situación dispar entre granjas, aunque no fue así para los grupos M3 y M8.

A diferencia de lo observado con los genes que caracterizan ETEC y STEC, con *rfb<sub>O157</sub>* se hallaron dos grupos con valores de OR de significancia estadística (M6 y M8), observándose también disparidad, en cuanto al hallazgo de positivos, a nivel de granja.

**Tabla 9. Asociación entre la presencia de los distintos genes con los grupos de animales según la edad de vida**

<i>Gen</i>	Grupo/granja	OR	IC 95 %	Valor P
<i>stx</i> <sub>1</sub>	-	ND	-	-
<i>stx</i> <sub>2</sub>	-	ND	-	-
<i>stx</i> <sub>2e</sub>	M6/1	6,57	2,49 - 17,27	< 0,05
	M6/2	3,28	1,29 - 8,35	< 0,05
	M6/10	4,29	1,68 - 10,49	< 0,05
<i>eltA</i>	-	ND	-	-
<i>estI</i>	M6/1	13,5	3,3 - 54,6	< 0,05
	M6/3	11,76	2,9 - 47,45	< 0,05
	M6/5	5,21	1,27 - 21,23	< 0,05
	M6/10	5,21	1,27 - 21,23	< 0,05
	M6/11	10,28	2,55 - 41,37	< 0,05
<i>rfb</i> <sub>O157</sub>	M6/2	43,5	5,2 - 3,63	< 0,05
	M6/5	33,14	3,9 - 2,75	< 0,05
	M6/6	10,5	1,22 - 90,66	< 0,05
	M6/8	10,5	1,22 - 90,66	< 0,05
	M6/10	95,28	10,9 - 830	< 0,05
	M8/1	16,78	2 - 140	< 0,05

OR: *odds ratio* (riesgo relativo aproximado). IC: intervalo de confianza. ND: no disponible (la probabilidad de detectar cerdos positivos es tan baja que no puede ser determinada con exactitud y previsión).

**Etapa 3: Aislamiento, caracterización fenotípica, genotípica y subtipificación molecular de los aislamientos de *Escherichia coli* toxigénicos y *Escherichia coli* O157 no toxigénicos**

**4.3 Recuperación de STEC, ETEC y *Escherichia coli* O157 no toxigénicos**

Sobre un total de 353 animales detectados como portadores de genes característicos de STEC, ETEC y *E. coli* O157 no toxigénicos, se recuperaron 74 (21%) aislamientos (índice de recuperación 0,21). En la tabla 10 se describe los índices de recuperación de cada uno de ellos.

De los aislamientos recuperados, 21 se identificaron como STEC (7 presentaron *stx*<sub>1</sub>, dos *stx*<sub>2</sub> y 12 *stx*<sub>2e</sub>); 40 se identificaron como ETEC (se incluyeron los que presentaron alguno de los genes que caracterizan ETEC solos o combinados con el *stx*<sub>2e</sub>); 10 *E. coli* O157 no toxigénicos y 3 EAEC (sólo presentaron como indicador de virulencia el gen *astA*). En la tabla 11 se expresa la cantidad de cepas aisladas por granja, así como los genotipos observados.

**Tabla 10: Índice de recuperación de cepas ETEC, STEC y *Escherichia coli* O157 no toxigénicos**

Genotipo	Detectados	Recuperados	Índice de recuperación
<b>STEC</b>	<b>82</b>	<b>21</b>	<b>0,26</b>
<i>stx</i> <sub>1</sub>	10	7	0,7
<i>stx</i> <sub>2</sub>	3	2	0,66
<i>stx</i> <sub>2e</sub>	69	12	0,17
<b>ETEC</b>	<b>150</b>	<b>43<sup>a</sup></b>	<b>0,29</b>
<b><i>E. coli</i> O157</b>	<b>121</b>	<b>26<sup>b</sup></b>	<b>0,21</b>

STEC: *Escherichia coli* productor de toxina Shiga. ETEC: *Escherichia coli* enterotoxigénico. a: Inicialmente las tres cepas EAEC se recuperaron como ETEC. b: incluye *E. coli* no toxigénicos y ETEC.

**Tabla 11. Genotipos de *Escherichia coli* recuperados a partir de cerdos sin manifestación clínica de diarrea provenientes de 11 granjas de producción porcina**

Granja	Patotipos (cantidad de cepas)
1	STEC: <i>stx</i> <sub>2e</sub> (1)
2	STEC: <i>stx</i> <sub>2e</sub> (3); ETEC/ <i>stx</i> <sub>2e</sub> (1); <i>E. coli</i> O157 (1)
3	STEC: <i>stx</i> <sub>1</sub> (4); STEC: <i>stx</i> <sub>2e</sub> (4); ETEC/ <i>stx</i> <sub>2e</sub> (1); ETEC (10); <i>E. coli</i> O157 no toxigénico (1); EAEC (2)
4	ETEC (2)
5	STEC: <i>stx</i> <sub>2e</sub> (1); ETEC/ <i>stx</i> <sub>2e</sub> (1); ETEC (14)
6	ETEC (1); <i>E. coli</i> O157 no toxigénico (1)
7	STEC: <i>stx</i> <sub>1</sub> (1), <i>stx</i> <sub>2</sub> (2); ETEC (1)
8	STEC: <i>stx</i> <sub>2e</sub> (2); ETEC (2); <i>E. coli</i> O157 no toxigénico (1)
9	STEC: <i>stx</i> <sub>1</sub> (1); STEC: <i>stx</i> <sub>2e</sub> (1); ETEC (5); EAEC (1)
10	ETEC (1); <i>E. coli</i> O157 no toxigénicos (6)
11	STEC: <i>stx</i> <sub>1</sub> (1); ETEC (1)

#### 4.4 Caracterización fenotípica de STEC, ETEC y *E. coli* O157 no toxigénicos

**4.4.1 Pruebas fisiológicas y bioquímicas.** El total de los aislamientos (74) fermentó la glucosa, con producción de gas, la lactosa y produjeron lisina decarboxilasa. Ningún aislamiento fermentó la celobiosa ni utilizó al citrato de sodio como única fuente de carbono. No se observó producción de ácido sulfhídrico ni pigmento. Una de las diferencias fenotípicas observadas fue en relación con la fermentación del sorbitol, 64 (86,5 %) de los aislamientos lo utilizaron, los patotipos que no lo hicieron fueron ocho STEC (*stx*<sub>1</sub>, *stx*<sub>2</sub>, *stx*<sub>2e</sub>, *stx*<sub>2e</sub>/*astA*) y dos EAEC.

Otra diferencia se observó en cuanto a la producción de indol, 59 (79,7 %) aislamientos fueron positivos. Los genotipos que no lo pudieron hacer son *stx*<sub>2e</sub> (2 aislamientos), *estIII/rfb*<sub>O157</sub> (1 aislamiento), *astA/estIII/rfb*<sub>O157</sub>/*aidA* (2 aislamientos), *estIII/rfb*<sub>O157</sub>/*aidA* (9 aislamientos) y *stx*<sub>2e</sub>/*astA* (1 aislamiento).

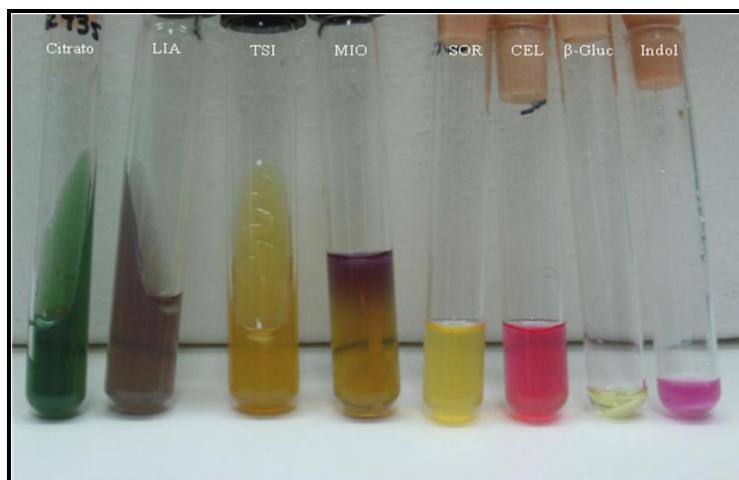
De los 74 aislamientos analizados, 64 (86,5 %) decarboxilaron la ornitina. Los genotipos que no lo pudieron hacer son *estII/estII* (7), *estIII/astA/aidA* (1), *estII/estIII/stx*<sub>2e</sub> (1) y *rfb*<sub>O157</sub> (1).

Con respecto a la producción de la enzima β-glucuronidasa, 52 aislamientos (70,3 %) la produjeron. Dieciséis *E. coli rfb*<sub>O157</sub> toxigénicos, 1 *E. coli rfb*<sub>O157</sub> no toxigénico, 4 ETEC y 1 *astA/aidA* fueron negativos. Este último aislamiento no fermentó el sorbitol. Siete aislamientos de la granja 7 pertenecientes al grupo M6, compartieron la característica de ser *rfb*<sub>O157</sub>/*estIII/aidA*; indol y β-glucuronidasa.

Sólo tres (4,2 %) aislamientos fueron β-hemolíticos: dos STEC (*stx*<sub>2e</sub>) y uno EAEC (*astA*).

En la tabla 12 se detalla la cantidad de aislamientos con comportamiento positivo a las diferentes pruebas fisiológicas y bioquímica realizadas, discriminados por granja.

**Imagen 10. Pruebas fisiológica y bioquímicas utilizadas para la tipificación de *Escherichia coli***



LIA: agar lisina hierro. TSI: agar hierro triple azúcar. MIO: agar movilidad, indol, ornitina. SOR: fermentación de sorbitol. CEL: fermentación de celobios.  $\beta$ -gluc: producción de  $\beta$ -glucuronidasa. Indol: producción de indol.

**4.4.2 Sensibilidad antimicrobiana.** El total de los aislamientos (74) fue sensible a cefotaxima (CTX), cefoxitina (FOX), colistina (COL) y amicacina (AKN). El porcentaje de sensibilidad observado frente al resto de los beta lactámicos probados fue 83,8 % frente a ampicilina (AMP), 94,6 % cefalotina (CEF) y 95,9 % amoxicilina/ácido clavulánico (AMC). Con respecto a los aminoglucósidos, gentamicina (GEN) y estreptomina (S) el valor de aislamientos sensibles fue de 98,6 % y 48,6 %, respectivamente. El 94,6 % mostró sensibilidad frente a nitrofurantoína (NIT). El 79,7 % frente a fosfomicina (FOSF) y el 67,6 % frente a trimetoprima-sulfametoxazol (TMS). El menor porcentaje de sensibilidad se observó frente a tetraciclina 2,7 %.

Con respecto al comportamiento de los 74 aislamientos frente al ácido nalidíxico (NAL) y ciprofloxacina (CIP), fueron sensibles 46 (62,2 %) y 66 (89,2 %) respectivamente.

Mostraron sensibilidad frente al cloranfenicol (CMP), 50 aislamientos (67,6 %) mientras que 33 (44,6 %) lo fueron frente al florfenicol (FLOR).

En la tabla 13 se muestra el comportamiento del total de los aislamientos frente a los 17 antimicrobianos. En la tabla 14, se observa el comportamiento de las diferentes categorías de *E. coli* estudiados y en la tabla 15, se detalla el porcentaje de aislamientos sensibles encontrados por granja.

De los 74 *E. coli*, sólo tres fueron sensibles a los 17 antimicrobianos analizados. Los *E. coli* que fueron clasificados como multirresistentes fueron 30 (40,5 %). En la tabla 16, se muestra la cantidad de este tipo de aislamientos observados por granja, así como sus fenotipos.

Tabla 12. Características bioquímicas de STEC, ETEC y *E. coli* O157 no toxigénicos aislados de cerdos sin manifestación clínica de diarrea

Granja	Glucosa	Lactosa	Sorbitol	Celobiosa	Prod. de gas	Prod. SH <sub>2</sub>	Citrato de sodio	Indol	B-glucuronidasa	ODC	LDC	Pigmento	B-hemólisis
1 (1)	100	100	100	0	100	0	0	100	100	100	100	0	50
2 (5)	100	100	100	0	100	0	0	60	80	100	100	0	0
3 (22)	100	100	77	0	100	0	0	100	95	63	100	0	0
4 (2)	100	100	100	0	100	0	0	0	100	100	100	0	0
5 (16)	100	100	100	0	100	0	0	31	37	100	100	0	0
6 (2)	100	100	100	0	100	0	0	100	100	50	100	0	0
7 (4)	100	100	50	0	100	0	0	100	100	100	100	0	0
8 (5)	100	100	80	0	100	0	0	100	100	100	100	0	0
9 (8)	100	100	75	0	100	0	0	100	37	87	100	0	25
10 (7)	100	100	100	0	100	0	0	100	100	100	100	0	0
11 (2)	100	100	100	0	100	0	0	100	100	100	100	0	0

STEC: *Escherichia coli* productor de toxina Shiga. ETEC: *Escherichia coli* enterotoxigénico. EPEC: *Escherichia coli* enteropatógeno. (n): cantidad de aislamientos analizados. Valores expresados en porcentaje de cepas positivas. ODC: ornitina decarboxilasa. LDC: lisina decarboxilasa.

**Tabla 13. Comportamiento de *Escherichia coli* toxigénicos y *Escherichia coli* O157 no toxigénicos aislados de cerdos sin manifestación clínica de diarrea frente a diferentes antimicrobianos**

Antimicrobiano	Cantidad de cepas Sensibles (%)	Cantidad de cepas con Sensibilidad Intermedia (%)	Cantidad de cepas Resistentes (%)
AMP	62 (83,8)	2 (2,7)	10 (13,5)
AMC	71 (95,9)	1 (1,3)	2 (2,6)
CEF	70 (94,6)	2 (2,7)	2 (2,7)
CTX	74 (100)	0	0
FOX	74 (100)	0	0
GEN	73 (98,6)	0	1 (1,3)
AKN	74 (100)	0	0
S	36 (48,6)	2 (2,7)	36 (48,6)
TET	2 (2,7)	3 (4)	69 (93,2)
NAL	46 (62,2)	5 (6,7)	23 (31,1)
CIP	66 (89,2)	1 (1,3)	7 (9,5)
COL	74 (100)	0	0
NIT	70 (94,6)	1 (1,3)	3 (4)
CMP	50 (67,6)	2 (2,7)	22 (29,7)
FLOR	33 (44,6)	13 (17,6)	28 (37,8)
TMS	50 (67,6)	7 (9,4)	17 (23)
FOSF	59 (79,7)	6 (8,1)	9 (12,2)

AMP: ampicilina. AMC: amoxicilina-ácido clavulánico. CEF: cefalotina. CTX: cefotaxima. FOX: cefoxitina. GEN: gentamicina. AKN: amicacina. S: estreptomycin. TET: tetraciclina. NAL: ácido nalidíxico. CIP: ciprofloxacina. COL: colistina. NIT: nitrofurantoína. CMP: cloranfenicol. FLOR: florfenicol. TMS: trimetoprima-sulfametoxazol. FOSF: fosfomicina.

**Tabla 14. Comportamiento de STEC, ETEC y *Escherichia coli* O157 no toxigénicos aislados de cerdos sin manifestación clínica de diarrea frente a diferentes antimicrobianos**

ATM	STEC ( <i>stx</i> <sub>1</sub> / <i>stx</i> <sub>2</sub> / <i>stx</i> <sub>2e</sub> ) (n 21)	ETEC/EAEC (n 43)	<i>E. coli</i> O157 (n 10)
	Cepas Sensibles (%)	Cepas Sensibles (%)	Cepas Sensibles (%)
AMP	16 (76)	40 (93)	8 (80)
AMC	21 (100)	41 (95)	10 (100)
CEF	20 (95)	42 (98)	10 (100)
CTX	21 (100)	43 (100)	10 (100)
FOX	21 (100)	43 (100)	10 (100)
GEN	21 (100)	42 (98)	10 (100)
AKN	21 (100)	43 (100)	10 (100)
S	6 (28)	24 (56)	1 (10)
TET	3 (14)	3 (7)	0
NAL	15 (71)	27 (63)	7 (70)
CIP	18 (86)	38 (88)	9 (90)
COL	21 (100)	43 (100)	10 (100)
NIT	20 (95)	41 (95)	10 (100)
CMP	17 (81)	30 (70)	8 (80)
FLOR	16 (76)	26 (60)	7 (70)
TMS	14 (67)	36 (84)	8 (80)
FOSF	20 (95)	37 (86)	8 (80)
MRT	<i>stx</i> <sub>1</sub> : 0/7; <i>stx</i> <sub>2</sub> : 2/2; <i>stx</i> <sub>2e</sub> : 8/12	18 (42)	3 (30)

STEC: *Escherichia coli* productor de toxina Shiga. ETEC: *Escherichia coli* enterotoxigénico. ATM: antimicrobiano. (n) cantidad de cepas. AMP: ampicilina. AMC: amoxicilina-ácido clavulánico. CEF: cefalotina. CTX: cefotaxima. FOX: cefoxitina. GEN: gentamicina. AKN: amicacina. S: estreptomicina. TET: tetraciclina. NAL: ácido nalidíxico. CIP: ciprofloxacina. COL: colistina. NIT: nitrofurantoína. CMP: cloranfenicol. FLOR: florfenicol. TMS: trimetoprima-sulfametoxazol. FOSF: fosfomicina. MRT: cepas multirresistentes.

**Tabla 15: Comportamiento frente a diferentes antimicrobianos de STEC, ETEC y *Escherichia coli* O157 no toxigénicos aislados de cerdos sin manifestación clínica de diarrea. Discriminación por granja**

ATM	Granja																
	Ampicilina	Amoxicilina/ac. slavulánico	Cefalotina	Cefotaxima	Cefoxitina	Gentamicina	Amicacina	Estreptomidina	Tetraciclina	A.c. Nalidixico	Ciprofloxacina	Colistina	Nitrofurantoina	Cloranfenicol	Florfenicol	Trimetoprima - Sulfametoxazol	Fosfomicina
<b>1 (1)</b>	0	100	100	100	100	100	100	0	0	100	100	100	100	100	100	100	100
<b>2 (5)</b>	40	80	80	100	100	100	100	0	0	80	100	100	100	40	20	40	60
<b>3 (22)</b>	95	100	100	100	100	100	100	0	0	45	82	100	100	18	18	50	100
<b>4 (2)</b>	100	100	100	100	100	100	100	100	0	100	100	100	100	100	0	100	0
<b>5 (16)</b>	100	100	100	100	100	100	100	87	0	69	100	100	81	100	56	81	62
<b>6 (2)</b>	0	100	100	100	100	100	100	50	0	100	100	100	100	0	0	50	100
<b>7 (4)</b>	100	100	100	100	100	100	100	25	25	25	100	100	100	100	50	25	75
<b>8 (5)</b>	40	80	60	100	100	100	100	60	0	0	20	100	100	80	80	40	100
<b>9 (8)</b>	87	87	87	100	100	87	100	87	0	62	100	100	100	100	75	100	75
<b>10 (7)</b>	86	100	100	100	100	100	100	100	14	86	100	100	100	100	71	100	71
<b>11 (2)</b>	100	100	100	100	100	100	100	50	50	100	100	100	50	100	50	100	100

STEC: *Escherichia coli* productor de toxina Shiga. ETEC: *Escherichia coli* enterotoxigénico. (n): cantidad de cepas analizadas. ATM: antimicrobianos. Los valores expresados corresponden al porcentaje de cepas sensibles.

**Tabla 16. Fenotipos multirresistente de STEC, ETEC y *Escherichia coli* O157 no toxigénicos aislados de cerdos sin manifestación clínica de diarrea**

Granja	Aislamientos multirresistentes	Fenotipo multirresistente
1 (1)	0	
2 (5)	4	AMP, S, TET, CMP, FLOR, TMS; S, TET, CMP, FLOR, TMS, FOSF; AMP, AMC, S, TET, FOSF
3 (22)	17	S, TET, CMP, FLOR; S, TET, CMP, FLOR, TMS; S, TET, NAL, CMP, FLOR; S, TET, NAL, CIP, CMP, FLOR; S, TET, NAL, CMP, FLOR, TMS; S, TET, NAL, CIP, CMP, FLOR, TMS
4 (2)	0	
5 (16)	0	
6 (2)	1	AMP, S, TET, FLOR
7 (4)	2	S, TET, NAL, TMS; S, TET, NAL, TMS, FLOR
8 (5)	6	S, TET, NAL, CIP; AMP, TET, NAL CIP, TMS; AMP, CEF, TET, NAL, TMS; AMP, TET, NAL, CIP, CMP, FLOR, TMS
9 (8)	1	AMP, AMC, CEF, TET, FLOR
10 (7)	0	
11 (2)	0	

STEC: *Escherichia coli* productor de toxina Shiga. ETEC: *Escherichia coli* enterotoxigénico. (n): cantidad de cepas analizadas. AMP: ampicilina. CEF: cefalotina. AMC: amoxicilina-ácido clavulánico. S: estreptomicina. TET: tetraciclina. TMS: trimetoprima-sulfametoxazol. CMP: cloranfenicol. FLOR: florfenicol. FOSF: fosfomicina. NAL: ácido nalidíxico. CIP: ciprofloxacina.

**Resistencia antimicrobiana.** Sobre la base de las pruebas de sensibilidad antimicrobiana, se determinaron 35 patrones de resistencia, 34 aislamientos (45,9 %) agruparon en cinco patrones: 16,2 % TET; 9,4 % S, TET; 8,1 % S, TET, CMP, FLOR; 6,7 % TET, FOSF; 5,4 % S, TET, NAL, CMP, TMS, FLOR.

Analizando las 21 STEC, se observaron 16 patrones diferentes (tabla 17).

Las 3 cepas EAEC pertenecieron a los patrones 11, 14 y 17 (tabla 18).

*E. coli* O157 no toxigénicos se agruparon en seis patrones: 13, 14, 16, 18, 19 y 20 (tabla 18).

**Tabla 17. Patrones de resistencia antimicrobiana de STEC aislados de cerdos sin manifestación clínica de diarrea**

Patrones	STEC			Total de aislamientos
	<i>stx</i> <sub>1</sub>	<i>stx</i> <sub>2</sub>	<i>stx</i> <sub>2e</sub>	
1: S, TET	4	-	-	4
24: S, TET, NAL	1	-	-	1
4: NIT	1	-	-	1
2: sin resistencia	1	-	-	1
5: S, TET, NAL, TMS, FLOR	-	1	-	1
6: S, TET, NAL, TMS	-	1	-	1
7: AMP, S, TET	-	-	1	1
8: AMP, S, TET, CMP, TMS, FLOR	-	-	2	2
9: S, TET, CMP, TMS, FOSF, FLOR	-	-	1	1
10: S, TET, CMP, TMS, FLOR	-	-	1	1
11: S, TET, CMP, FLOR	-	-	2	2
12: S, CMP, FLOR	-	-	1	1
13: TET, NAL	-	-	1	1
14: TET	-	-	1	1
15: AMP, TET, NAL, TMS	-	-	1	1
16: AMP, CEF, TET, NAL, TMS	-	-	1	1

STEC: *Escherichia coli* productor de toxina Shiga. S: estreptomicina; TET: tetraciclina; NAL: ácido nalidíxico; NIT: nitrofurantoína; TMS: trimetoprima-sulfametoxazol; FLOR: florfenicol; AMP: ampicilina; CMP: cloranfenicol; FOSF: fosfomicina.

**Tabla 18. Patrones de resistencia antimicrobiana de *Escherichia coli* O157 no toxigénicos y EAEC aislados de cerdos sin manifestación clínica de diarrea**

Patrones	<i>E. coli</i> O157	EAEC	Total de cepas
11: S, TET, CMP, FLOR	-	1	1
13: TET, NAL	1	-	1
14: TET	3	2	5
16: S, TET, NAL, CMP, TMS, FLOR	1	-	1
17: S, TET, NAL, CIP, CMP, TMS, FLOR	-	1	1
18: AMP, S, TET, FLOR	1	-	1
19: AMP, TET, NAL, CIP, CMP, TMS, FOSF	1	-	1
20: TET, FOSF	2	-	2

EAEC: *Escherichia coli* enteroagregativo. S: estreptomina; TET: tetraciclina; CMP: cloranfenicol; FLOR: florfenicol; NAL: ácido nalidíxico; AMP: ampicilina; CEF: cefalotina; CIP: ciprofloxacina; TMS: trimetoprima-sulfametoxazol; FOSF: fosfomicina.

ETEC se distribuyó en 23 patrones. Sólo compartieron STEC, EAEC y *E. coli* O157 no toxigénicos, 8 patrones: 1, 2, 3, 10, 11, 13, 14 y 20. El patrón 14 (TET), presentó 15 % de cepas, siendo este el mayor valor observado. Lo siguieron con 7,5 % los patrones 11, 13 y 20. Coincidentemente, los patrones 11 y 13 se observaron en STEC, EAEC y *E. coli* O157 no toxigénicos. La tabla 19 describe los patrones de resistencia observados discriminados por cada grupo ETEC analizado: ETEC, ETEC/*stx*<sub>2e</sub>, ETEC/O157. Tanto el grupo ETEC/O157 como ETEC se distribuyeron en 10 patrones, aunque es importante mencionar que sólo compartieron 2 (13 y 14).

**Tabla 19. Patrones de resistencia antimicrobiana de ETEC aislados de cerdos sin manifestación clínica de diarrea**

Patrones	ETEC			Total de aislamientos
	ETEC/ <i>stx</i> <sub>2e</sub>	ETEC	ETEC/ <i>rfb</i> <sub>O157</sub>	
1: S, TET	-	1	-	1
2: sin resistencia	1	1	-	2
3: TET, FLOR	-	-	1	1
10: S, TET, CMP, TMS, FLOR	-	2	-	2
11: S, TET, CMP, FLOR	-	3	-	3
13: TET, NAL	-	1	2	3
14: TET	-	2	4	6
20: TET, FOSF	-	-	3	3
21: AMP, AMC, S, TET, FOSF	1	-	-	1
22: S, TET, NAL, CIP, CMP, FLOR	1	1	-	2
23: S, TET, NAL, CMP, FLOR	-	2	-	2
24: S, TET, NAL	-	-	1	1
25: TET, NIT	-	-	1	1
26: TET, NAL, FOSF	-	-	1	1
27: TET, TMS	-	-	1	1
28: TET, NIT, FOSF	-	-	1	1
29: S, TET, FLOR	-	-	1	1
30: AMP, TET, TMS	-	1	-	1
31: NAL	-	1	-	1
32: AMP, AMC, CEF, TET, FLOR	-	1	-	1
33: S, TET, NAL, CIP	-	2	-	2
34: GEN, TET, FLOR	-	1	-	1
35: AMP, CEF, TET, NAL, TMS	-	3	-	3

ETEC: *Escherichia coli* enterotoxigénico. S: estreptomicina; TET: tetraciclina; FLOR: florfenicol; CMP: cloranfenicol; TMS: trimetoprima-sulfametoxazol; NAL: ácido nalidíxico; FOSF: fosfomicina; AMP: ampicilina; AMC: amoxicilina-ácido clavulánico; CIP: ciprofloxacina; NIT: nitrofurantoína; GEN: gentamicina; CEF: cefalotina.

**4.4.3 Serotipificación.** La distribución de los serogrupos entre los 74 aislamientos de *E. coli* se muestran en la tabla 20. Se pudieron serotipificar 56 cepas (76 %), clasificándose como antígeno O no tipificables a 18 (24 %) (ONT). En el presente trabajo se encontraron 12 serogrupos, siendo el dominante O157 en 24 aislamientos (32,4 %); seguido por O8 (18,9 %); O20 (5,4 %); O7 (4 %); O2, O36 y O120 (2,7 %); O54, O60, O8/O60, O115 y O149 (1,3 %).

Con respecto al antígeno H, se determinó en 36 cepas (48,6 %), el más frecuentemente encontrado fue H19 (21,6 %), asociado con O157 y O36. Seguido por H31 (5,4 %), asociado con O8. La distribución de los antígenos O y H conjuntamente con su asociación a los diferentes patotipos (STEC, ETEC, EAEC y *E. coli* O157 no toxigénicos), se describen en la tabla 20.

En las tablas 21, 22, 23 y 24 se menciona la distribución de los serotipos en los diferentes patotipos (STEC, ETEC, EAEC y *E. coli* O157) y por granja.

**Tabla 20. Serotipos de STEC, ETEC y *Escherichia coli* O157 no toxigénicos aislados de cerdos sin manifestación clínica de diarrea**

Grupo O	Grupo H	Cantidad de aislamientos	Patotipo
O2	H <sup>-</sup>	2	STEC (2)
O7	H <sup>-</sup> (1); H15 (2)	3	ETEC
O8	H <sup>-</sup> (8); H26 (2); H31 (4)	14	ETEC
O20	H <sup>-</sup>	4	STEC (3); EAEC (1)
O36	H19	2	STEC
O54	H2	1	ETEC
O60	H <sup>-</sup>	1	ETEC
O8/O60	H23	1	EAEC
O115	H <sup>-</sup>	1	ETEC
O149	H <sup>-</sup>	1	ETEC
O120	H <sup>-</sup>	2	STEC (1); EAEC (1)
O157	H16	1	<i>E. coli</i> O157 no toxigénico
	H19	14	ETEC
	H21	1	<i>E. coli</i> O157 no toxigénico
	H <sup>-</sup>	6	<i>E. coli</i> O157 no toxigénico (6)
	H <sup>?</sup>	1	<i>E. coli</i> O157 no toxigénico
ONT	H42	1	EAEC
	H <sup>-</sup>	11	ETEC (5); STEC (6)
	H14	3	STEC
	H17	1	STEC
	H19	1	STEC
	H45	2	STEC

STEC: *Escherichia coli* productor de toxina Shiga. ETEC: *Escherichia coli* enterotoxigénico. ONT: serogrupo no tipificable

#### 4.4.4 Caracterización genotípica

**4.4.4.1 Caracterización genotípica de STEC.** Se recuperaron 21 STEC: siete portadoras del gen *stx*<sub>1</sub> y 14 *stx*<sub>2</sub> de las cuales 12 pertenecieron a la variante *stx*<sub>2e</sub>. Sumados a los genes anteriormente citados, la caracterización genotípica concluyó con la búsqueda de *ehxA* (enterohemolisina) y *saa* (adhesina autoaglutinante).

De las siete STEC/*stx*<sub>1</sub>, se observó el mismo perfil genotípico en seis, presentando como marcadores de virulencia los genes que codifican la producción de la toxina Stx1 y la enterohemolisina (*ehxA*). Estas se aislaron de las granjas 3, 9 y 11, ubicadas en las localidades de Salto, Henderson y Pergamino. La restante, se aisló de una granja localizada en Carmen de Areco (Granja 7) y sólo presentó como marcador de virulencia al gen *stx*<sub>1</sub>. De este último establecimiento, también se aislaron las dos STEC/*stx*<sub>2</sub>, siendo, el único marcador de virulencia. Todos estos aislamientos se obtuvieron a partir de animales de maternidad (M3) (tabla 21).

A partir de seis granjas ubicadas en la provincia de Buenos Aires (identificadas como 1, 2, 3, 5, 8 y 9), se aislaron las 12 STEC/*stx*<sub>2e</sub>, de las cuales cinco presentaron como único marcador de virulencia al gen citado y cuatro (33 %) la combinación *stx*<sub>2e</sub>/*astA*. De los 12 aislamientos, en uno sólo se detectó la presencia del gen que codifica la adhesina fimbrial F18 (*fedA*) conjuntamente con el gen *aidA*. En 3 STEC/*stx*<sub>2e</sub> (25 %), se observó la presencia del gen *aidA*. En la tabla 21 se describe la caracterización genotípica de este grupo de aislamientos. En ninguna se detectó la presencia de los genes *ehxA*, *eae*, *saa*, *paa*, *faeG*, *fanC*, *fasA* ni *F41*.

**Tabla 21. Caracterización genotípica y serotipos de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga aislados de cerdos sin manifestación clínica de diarrea**

Granja	Localización	Serotipo	Genotipo (n)
1	Marcos Paz	ONT:H17	<i>stx<sub>2e</sub>/fedA/aidA</i> (1)
2	Salto	ONT:H19; O36:H19	<i>stx<sub>2e</sub></i> (2)
		O36:H19	<i>stx<sub>2e</sub>/aidA</i> (1)
3	Salto	ONT:H <sup>-</sup>	<i>stx<sub>1</sub>/ehxA</i> (4)
		O20:H <sup>-</sup>	<i>stx<sub>2e</sub>/aidA/astA</i> (1)
		O20:H <sup>-</sup>	<i>stx<sub>2e</sub>/astA</i> (2)
		ONT:H <sup>-</sup>	<i>stx<sub>2e</sub>/aidA/astA</i> (1)
5	Inés Indart	O120:H <sup>-</sup>	<i>stx<sub>2e</sub>/astA</i> (1)
7	Carmen de Areco	ONT:H14	<i>stx<sub>1</sub></i> (1)
		ONT:H45	<i>stx<sub>2</sub></i> (2)
8	Saladillo	O2:H <sup>-</sup>	<i>stx<sub>2e</sub></i> (2)
9	Henderson	ONT:H14	<i>stx<sub>1</sub>/ehxA</i> (1)
9	Henderson	ONT:H <sup>-</sup>	<i>stx<sub>2e</sub></i> (1)
11	Pergamino	ONT:H14	<i>stx<sub>1</sub>/ehxA</i> (1)

ONT: serogrupo no tipificable.

**4.4.4.2 Caracterización genotípica de *Escherichia coli* O157.** La caracterización genotípica de *E. coli* O157 no toxigénicos y ETEC O157 concluyó, con la búsqueda de los genes *ehxA*, *fliC<sub>H7</sub>* y *saa*. Este último sólo se buscó en aquellos aislamientos en los cuales no se determinó la presencia del gen *eae*. Se caracterizaron como *E. coli* O157 no toxigénicos nueve aislamientos, uno como EAEC (presentó como gen marcador de virulencia *astA*) (tabla 22) y 16 como ETEC O157. Seis *E. coli* O157 no

toxigénicos fueron portadores del gen *eae*. ETEC O157 fueron negativos para este último gen. *E. coli* O157 no toxigénicos y ETEC O157 fueron negativos para los genes *ehxA*, *fliC<sub>H7</sub>* y *saa*.

**4.4.4.3 Caracterización genotípica de EAEC.** Se tipificaron como *E. coli* enteroagregativo, cuatro aislamientos. Tres de ellos se aislaron como ETEC portadores del gen *estI*, finalmente se re-tipificaron como EAEC portadores del gen *astA* y en uno de los casos *astA/aidA* (tabla 23).

**Tabla 22. Caracterización genotípica y serotipos de *Escherichia coli* O157 aislados de cerdos sin manifestación clínica de diarrea**

Granja	Localización	Serotipo	Genotipo (n)
3	Salto	O157:H16	<i>rfb</i> <sub>O157</sub> (1)
6	Venado Tuerto	O157:H21	<i>rfb</i> <sub>O157</sub> / <i>eae/aidA</i> (1)
8	Saladillo	O157:Hnt	<i>rfb</i> <sub>O157</sub> (1)
10	San Andrés de Giles	O157:H <sup>-</sup>	<i>rfb</i> <sub>O157</sub> / <i>eae/aidA</i> (5); <i>rfb</i> <sub>O157</sub> / <i>aidA</i> (1)

Hnt: antígeno H no tipificable.

**Tabla 23. Caracterización genotípica y serotipos de EAEC aislados de cerdos sin manifestación clínica de diarrea**

Granja	Localización	Serogrupo	Genotipo (n)
2	Salto	O157:H42	<i>rfb</i> <sub>O157</sub> / <i>astA</i> (1)
3	Salto	O20:H <sup>-</sup>	<i>astA</i> (1)
		O8/O60:H23	<i>astA</i> (1)
9	Henderson	O120:H <sup>-</sup>	<i>astA/aidA</i> (1)

EAEC: *Escherichia coli* enteroagregativo

**4.4.4.4 Caracterización genotípica de ETEC.** En total, se tipificaron como ETEC a 40 aislamientos. Estos se encontraron distribuidos en 10 de las 11 granjas muestreadas (91 %). Los genotipos *rfb*<sub>O157</sub>/*estII/aidA* y *estI/estII* de ETEC fueron los que se encontraron en mayor cantidad: 13 (32,5 %) y 10 (25 %), respectivamente. No se observó la combinación de genes *eltA/estI* (LT/STa) en ninguno de los aislamientos analizados. El gen que se identificó con mayor frecuencia fue *estII* (38/40), observándose en todos los casos, combinado con algunos de los otros genes buscados; seguido por *estI* (14/40), *astA* (9/40) y *eltA* (5/40) (tabla 24).

Con respecto a la presencia de los genes que codifican los factores de adhesión fimbriales y no fimbriales se obtuvieron los siguientes resultados:

Factores de adhesión fimbriales: de las 40 ETEC analizadas, se detectaron los genes que codifican las fimbrias F5, F6 y F18 en un aislamiento cada uno (*estI/estII/fanC*; *estII/astA/fasA*; *eltA/estII/astA/aidA/fedA*). Los genes que codifican las fimbrias F4 y F41 no se detectaron en ninguno de los aislamientos.

Factores de adhesión no fimbriales: en 31 ETEC se detectó el gen *aidA*, en todos los casos asociado al gen *estII*. Los genes *eae* y *paa* no se detectaron en ninguno de los aislamientos analizados.

**Tabla 24. Caracterización genotípica y serotipos de ETEC aislados de cerdos sin manifestación clínica de diarrea**

Granja	Localización	Serotipo	Genotipo (n)
2	Salto	O54:H21	<i>stx<sub>2e</sub>/estI/estII</i> (1)
3	Salto	O8:H- (6); O8:H26 (2)	<i>stx<sub>2e</sub>/estI/estII</i> (1); <i>estI/estII</i> (7)
		O60:H <sup>-</sup>	<i>estI/estII</i> (1)
		O149:H <sup>-</sup>	<i>estI/estII/fanC</i> (1)
		O7:H15	<i>eltA/estII/astA/aidA</i> (1)
4	Chacabuco	O157:H19	<i>rfb<sub>O157</sub>/estII/astA/aidA</i> (2)
5	Inés Indart	O157:H19	<i>rfb<sub>O157</sub>/estII/aidA</i> (11); <i>rfb<sub>O157</sub>/estII</i> (1)
		O115:H <sup>-</sup>	<i>rfb<sub>O157</sub>/estII/aidA</i> (1)
		ONT:H <sup>-</sup>	<i>estII/stx<sub>2e</sub></i> (1); <i>rfb<sub>O157</sub>/estII/aidA</i> (1)
6	Venado Tuerto	O8:H21	<i>estI/estII</i> (1)
7	Carmen de Areco	ONT:H <sup>-</sup>	<i>estII/astA/fasA</i> (1)
8	Saladillo	O7:H15	<i>eltA/estII/astA/aidA</i> (1)
		O7:H <sup>-</sup>	<i>eltA/estII/astA/aidA/fedA</i> (1)
9	Henderson	O8:H31	<i>estII/astA</i> (1); <i>estII/astA/aidA</i> (1)
		ONT:H <sup>-</sup>	<i>estII/astA/aidA</i> (1)
		O8:H31	<i>eltA/estII</i> (2)
10	San Andrés de Giles	ONT:H <sup>-</sup>	<i>estI</i> (1)
11	Pergamino	O8:H <sup>-</sup>	<i>estI/estII</i> (1)

ETEC: *Escherichia coli* enterotoxigénico. ONT: serogrupo no tipificable

#### 4.4.5 Subtipificación fenotípica

**4.4.5.1 Biotipificación.** Para establecer los diferentes patrones se observó el comportamiento de las cepas estudiadas en las pruebas de fermentación de sorbitol, producción de: indol,  $\beta$ -glucuronidasa y ornitina decarboxilasa. Se determinaron en total 8 biotipos (tabla 25).

**Tabla 25. Biotipos de STEC, ETEC y *Escherichia coli* O157 no toxigénicos aislados de cerdos sin manifestación clínica de diarrea**

Biotipos	Pruebas fisiológicas y bioquímicas				Cantidad de cepas (%)
	Indol	$\beta$ -glucuronidasa	ODC	Sorbitol	
1	+	+	+	+	27/74 (36,5)
2	-	+	+	+	8/74 (10,8)
3	+	-	+	+	12/74 (16,2)
4	+	+	+	-	9/74 (12,1)
5	+	+	-	+	9/74 (12,1)
6	-	-	+	+	7/74 (9,4)
7	+	-	+	-	1/74 (1,3)
8	+	-	-	+	1/74 (1,3)

STEC: *Escherichia coli* productor de toxina Shiga. ETEC: *Escherichia coli* enterotoxigénico. ODC: Ornitina decarboxilasa.

El total de STEC aislados (21), pertenecieron a 3 biotipos: 11 (52,3 %) al biotipo 1; 8 (38 %) al biotipo 4 y 2 (9,5 %) al biotipo 2. STEC portadores del gen *stx*<sub>1</sub> pertenecieron el biotipo 1, los portadores del gen *stx*<sub>2</sub> al biotipo 4 y los portadores del gen *stx*<sub>2e</sub>, a los tres biotipos mencionados (tabla 26).

**Tabla 26. Biotipos de STEC aislados de cerdos sin manifestación clínica de diarrea**

Biotipos	STEC			Total de cepas
	<i>stx</i> <sub>1</sub>	<i>stx</i> <sub>2</sub>	<i>stx</i> <sub>2e</sub>	
1	7	-	4	11
2	-	-	2	2
4	-	2	6	8

STEC: *Escherichia coli* productor de toxina Shiga. Biotipo 1: producción de indol,  $\beta$ -glucuronidasa, ornitina decarboxilasa y fermentación de sorbitol. Biotipo 2: producción  $\beta$ -glucuronidasa, ornitina decarboxilasa y fermentación de sorbitol; no producen indol. Biotipo 4: producción de indol,  $\beta$ -glucuronidasa, ornitina decarboxilasa y no fermentación de sorbitol.

Con respecto a *E. coli* O157 no toxigénicos, seis pertenecieron al biotipo 3, tres al biotipo 1 y uno al biotipo 5.

Las tres EAEC pertenecieron a biotipos diferentes: 1, 4 y 7.

Las cepas ETEC estuvieron distribuidas entre 6 biotipos. Pertenecieron al biotipo 1: 13 aislamientos; al biotipo 5: ocho ETEC; al biotipo 6: siete aislamientos; a los biotipos 2 y 3: seis ETEC para cada uno y al biotipo 8: un aislamiento. En la tabla 27 se describen los resultados obtenidos en cada uno de los grupos que conforman la categoría ETEC.

De los 25 aislamientos que presentan el gen *rfb*<sub>O157</sub> (15 ETEC/*rfb*<sub>O157</sub> y 10 *E. coli* O157 no toxigénicos), 16 pertenecieron a alguno de los biotipos que no presentan actividad  $\beta$ -glucuronidasa.

**Tabla 27. Biotipos de ETEC aislados de cerdos sin manifestación clínica de diarrea**

Biotipos	ETEC			Total de cepas
	ETEC/ <i>stx</i> <sub>2e</sub>	ETEC	ETEC/ <i>rfb</i> <sub>O157</sub>	
1	1	11	1	13
2	1	-	5	6
3	-	3	3	6
5	1	7	-	8
6	-	-	7	7
8	-	1	-	1

ETEC: *Escherichia coli* enterotoxigénico. ETEC/*stx*<sub>2e</sub>: ETEC portador del gen *stx*<sub>2e</sub>. ETEC/*rfb*<sub>O157</sub>: ETEC portador del gen *rfb*<sub>O157</sub>. Biotipo 1: producción de indol, β-glucuronidasa, ornitina decarboxilasa y fermentación de sorbitol. Biotipo 2: producción β-glucuronidasa, ornitina decarboxilasa y fermentación de sorbitol; no producen indol. Biotipo 3: producción de indol, ornitina decarboxilasa, fermentación de sorbitol y no producen β-glucuronidasa. Biotipo 5: producción de indol, β-glucuronidasa, fermentación de sorbitol y no producen ornitina decarboxilasa. Biotipo 6: producción ornitina decarboxilasa y fermentación de sorbitol, no producen indol ni β-glucuronidasa. Biotipo 8: producción de β-glucuronidasa y ornitina decarboxilasa, no producen indol ni fermentan sorbitol.

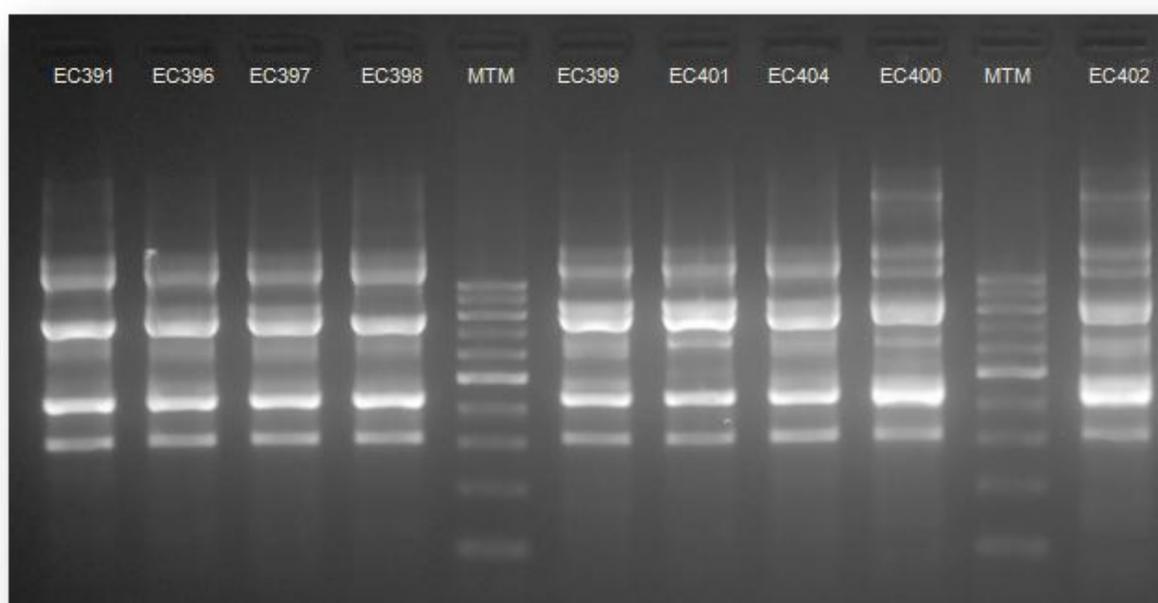
**4.4.5.2 Serotipificación.** Considerando los resultados obtenidos a partir de la determinación de los antígenos somático (O) y flagelar (H), se establecieron 25 patrones, siendo el predominante el serotipo O157:H19 observado en 14 ETEC, seguido por O8:H<sup>-</sup> (8 ETEC), O157:H<sup>-</sup> (6 *E. coli* O157 no toxigénico). En la tabla 20 se expresa la distribución de los serogrupos y serotipos para cada patotipo. La distribución de los patrones por genotipo, puede observarse en las tablas 21, 22, 23 y 24.

#### 4.4.6 Subtipificación molecular. ERIC-PCR

##### 4.4.6.1 STEC portadores de los genes *stx*<sub>1</sub> y *stx*<sub>2</sub>

Sobre un total de nueve STEC, portadores de los genes *stx*<sub>1</sub> y *stx*<sub>2</sub>, se establecieron seis patrones ERIC-PCR (A-F) con 59 % de similitud, los cuales presentaron entre 5 y 9 bandas en un rango comprendido entre 300 y 1500 pb (Imagen 11). Los patrones A – E corresponden a STEC portadores del gen *stx*<sub>1</sub> mientras que el patrón F pertenece a una cepa portadora del gen *stx*<sub>2</sub>.

**Imagen 11. Patrones ERIC-PCR de STEC portadores de los genes *stx*<sub>1</sub> y *stx*<sub>2</sub> aislados de cerdos sin manifestación clínica de diarrea**



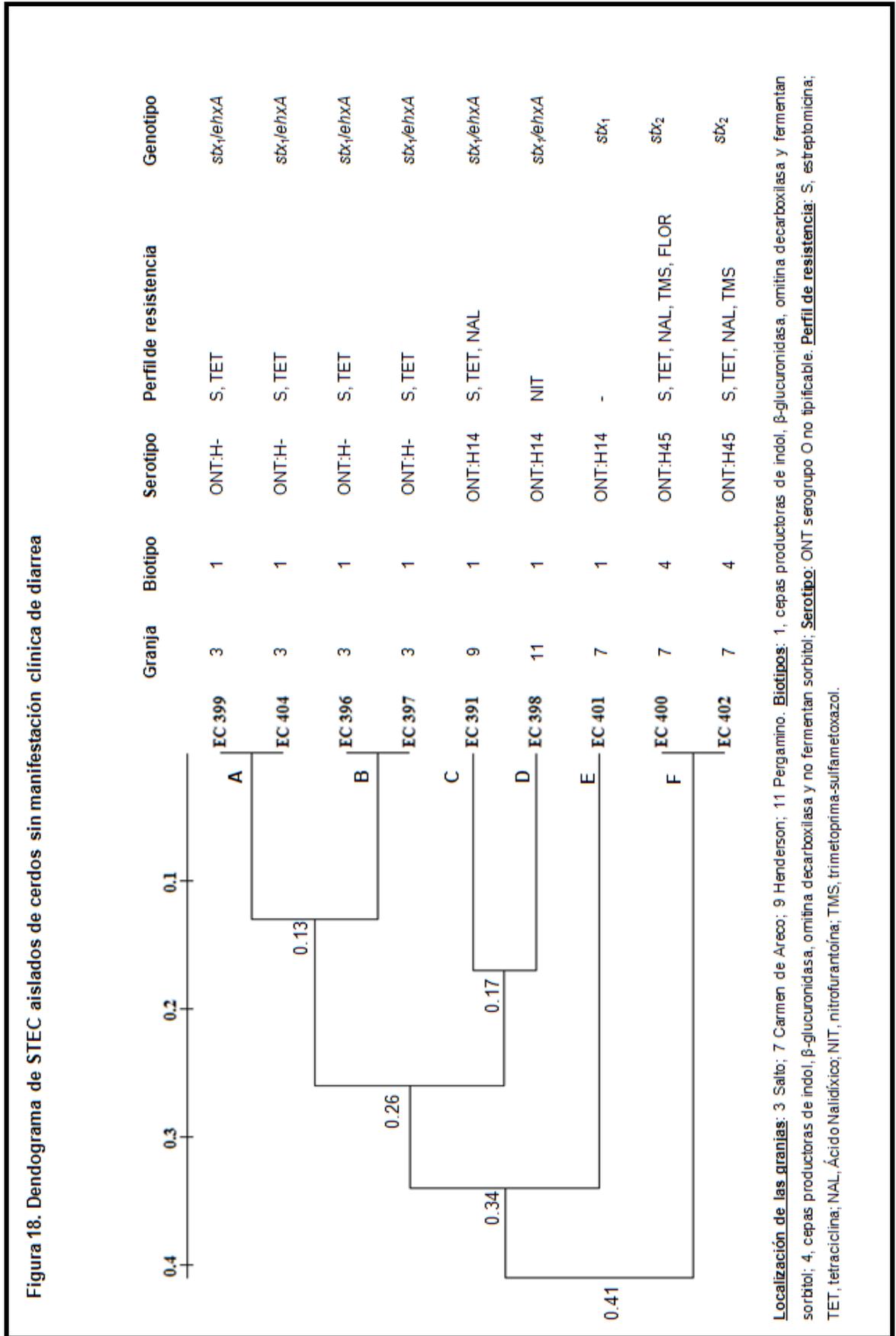
Líneas 1 - 4, 6 - 8: STEC portadores del gen *stx*<sub>1</sub>. Líneas 9 y 11: STEC portadores del gen *stx*<sub>2</sub>. Líneas 5 y 10: marcador de tamaño molecular Cien Marker (MTM).

Los patrones que se describen a continuación, corresponden a STEC aislados de diferentes animales de 21 días de vida (M3). Los patrones A (EC 399 y EC 404) y B (EC 396 y EC 397) agruparon los cuatro STEC/*stx*<sub>1</sub>/*ehxA*, provenientes de la granja 3, ubicada en la

ciudad de Salto. Entre A y B se observó una similitud de 87 %. Los patrones C (EC 391) y D (EC 398) agruparon a dos cepas con una similitud de 83 %. El primero, corresponde a un STEC/*stx*<sub>1</sub>/*ehxA* aislado en el partido de Henderson mientras que el segundo corresponde a uno aislado de una granja, localizada en el partido de Pergamino. Las dos presentaron el mismo genotipo y biotipo pero diferente perfil de resistencia antimicrobiana. El patrón E (EC 401) corresponde a un STEC/*stx*<sub>1</sub> aislado en Carmen de Areco y tiene una similitud de 66 % con los patrones previamente descriptos.

Finalmente, el patrón F corresponde a dos STEC portadores del gen *stx*<sub>2</sub> (EC 400 y EC 402). Se aislaron en una granja de Carmen de Areco. Entre ambos, sólo se observó diferencia en el perfil de resistencia antimicrobiana.

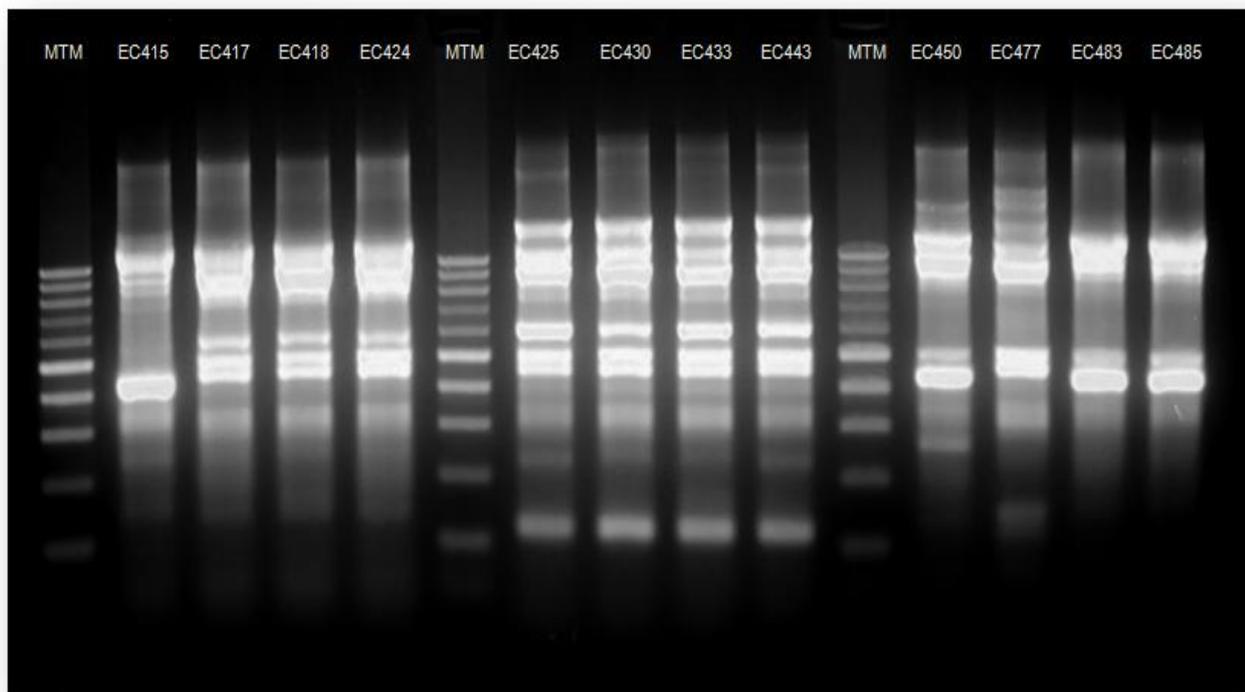
La figura 18 corresponde al dendograma generado a partir de los patrones ERIC-PCR, incluyéndose origen, biotipo, perfil de resistencia antimicrobiana y genotipo de cada uno de los aislamientos.



#### 4.4.6.2 STEC portadores del gen *stx*<sub>2e</sub>

Sobre un total de 12 STEC portadores del gen *stx*<sub>2e</sub>, se establecieron 10 patrones ERIC-PCR (A-J) con 27 % de similitud, los cuales presentaron entre 4 y 11 bandas en un rango comprendido entre 120 y 1500 pb aproximadamente (Imagen 12).

**Imagen 12. Patrones ERIC-PCR de STEC portadores del gen *stx*<sub>2e</sub> aislados de cerdos sin manifestación clínica de diarrea**



MTM: marcador de tamaño molecular Cien Marker. Líneas 2 - 5, 7 - 10, 12 - 15: STEC portadores del gen *stx*<sub>2e</sub>.

En el patrón A agruparon dos aislamientos (EC 418 y EC 424), provenientes de dos animales del grupo M6 (86 días de vida). Entre A y B (EC 417) se observó una similitud de 86 %. Si bien, EC 424 (O36:H19; *stx<sub>2e</sub>/aidA*) y EC 417 (ONT:H19; *stx<sub>2e</sub>*) se aislaron a partir de un mismo animal, sus características fenotípicas (serotipo y perfil de resistencia) y genotipo difieren, observándose entre ellos una similitud de 86 %. Estos tres aislamientos se obtuvieron en una granja localizada en Salto, provincia de Buenos Aires.

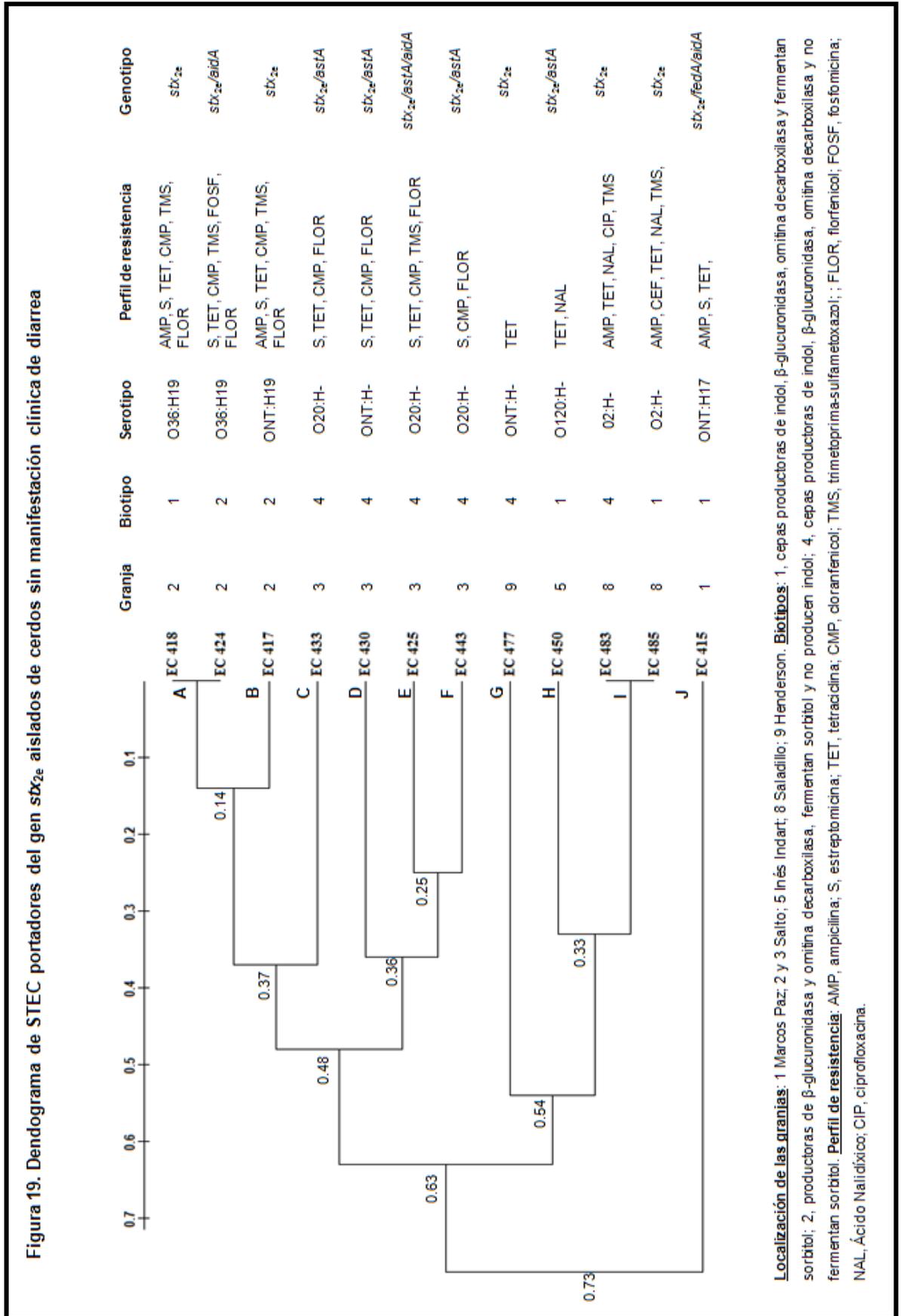
Los patrones C (EC 433) y D (EC 430) corresponden a dos aislamientos provenientes de un mismo cerdo de 86 días de vida (M6), presentando un 52 % de similitud. Conjuntamente con los patrones E (EC 425) y F (EC 443), provenientes de distintos animales del grupo M6, se aislaron de la granja identificada como 3, localizada en Salto, provincia de Buenos Aires. EC 433, EC 425 y EC 443, compartieron el mismo biotipo y serotipo (O20:H-).

El patrón I agrupa a dos STEC (EC 483 y EC 485), aislados en la granja 8, ubicada en el partido de Saladillo, a partir de cerdos del grupo M8 (165 días de vida). Comparten serotipo y genotipo, sin embargo difieren en biotipo y perfil de resistencia antimicrobiano.

El patrón G (EC 477) corresponde a un aislamiento proveniente de un animal del grupo M8, de la granja identificada como 9, localizada en el partido de Henderson.

Los patrones H (EC 450) y J (EC 415) corresponden a dos aislamientos provenientes de cerdos del grupo M6 (86 días de vida), de las granjas 5 y 1, ubicadas en los partidos de Inés Indart y Marcos Paz, respectivamente.

La figura 19 corresponde al dendograma generado a partir de los patrones ERIC-PCR, incluyéndose origen, biotipo, perfil de resistencia antimicrobiana y genotipo de cada uno de los aislamientos.



#### 4.4.6.3 *Escherichia coli* serotipo O157 (no ETEC)

Sobre un total de 10 *E. coli* O157 no ETEC analizadas, se establecieron cinco patrones ERIC-PCR (A-E) con 46 % de similitud, los cuales presentaron entre 6 y 10 bandas en un rango comprendido entre 150 y 1500 pb (Imagen 13).

En el patrón A, agruparon con 100 % de similitud, seis aislamientos (EC 452, EC 453, EC 454, EC 455, EC 575 y EC 576), provenientes de cuatro cerdos de 86 días de edad (M6), de la granja 10 (San Andrés de Giles). EC 575 y EC 576 comparten biotipo (3), serotipo (O157:H-), perfil de resistencia (TET, FOSF) y genotipo (*rfb*<sub>O157</sub>/*eae/aidA*) pero fueron aislados de diferentes animales. EC 454 y EC 455 se aislaron de un mismo animal, comparten biotipo, serotipo y genotipo entre ellos, y con los dos anteriores, pero difieren en el perfil de resistencia (TET y TET, NAL). EC 452 y EC 453 se aislaron de un mismo animal, comparten el mismo biotipo (1), serotipo (O157:H-) y perfil de resistencia (TET) pero difieren en su genotipo (*rfb*<sub>O157</sub>/*eae/aidA* y *rfb*<sub>O157</sub>/*aidA*).

El patrón B (EC 567), corresponde a un aislamiento proveniente de un animal del grupo M6 de la granja localizada en Venado Tuerto, Santa Fé. Presenta 80 % de similitud con el patrón A, aunque sólo comparte genotipo (*rfb*<sub>O157</sub>/*eae/aidA*) con alguno de sus integrantes. Pertenece al biotipo 5, serotipo O157:H21, perfil de resistencia AMP, S, TET, FLOR.

El patrón C (EC 423), corresponde a un aislamiento proveniente de un animal del grupo M6 de la granja 2, localizada en Salto. Presenta 57 % de similitud con los patrones anteriores (A y B). Pertenece al biotipo 3, serotipo O157:H42, perfil de resistencia TET; genotipo *rfb*<sub>O157</sub>/*astA*.

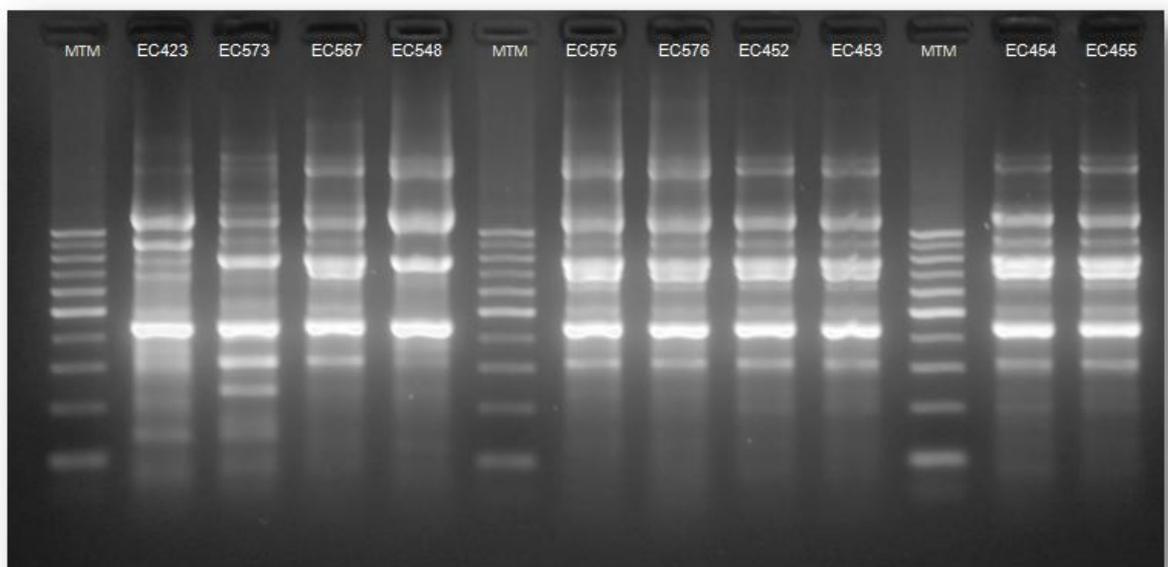
El patrón D (EC 573), corresponde a un aislamiento proveniente de un animal del grupo M6 de la granja 3, localizada en Salto. Presenta 49 % de similitud con los patrones

anteriores (A, B y C). Pertenece al biotipo 3, serotipo O157:H16, perfil de resistencia S, TET, NAL, CMP, TMS, FLOR; genotipo *rfb*<sub>O157</sub>.

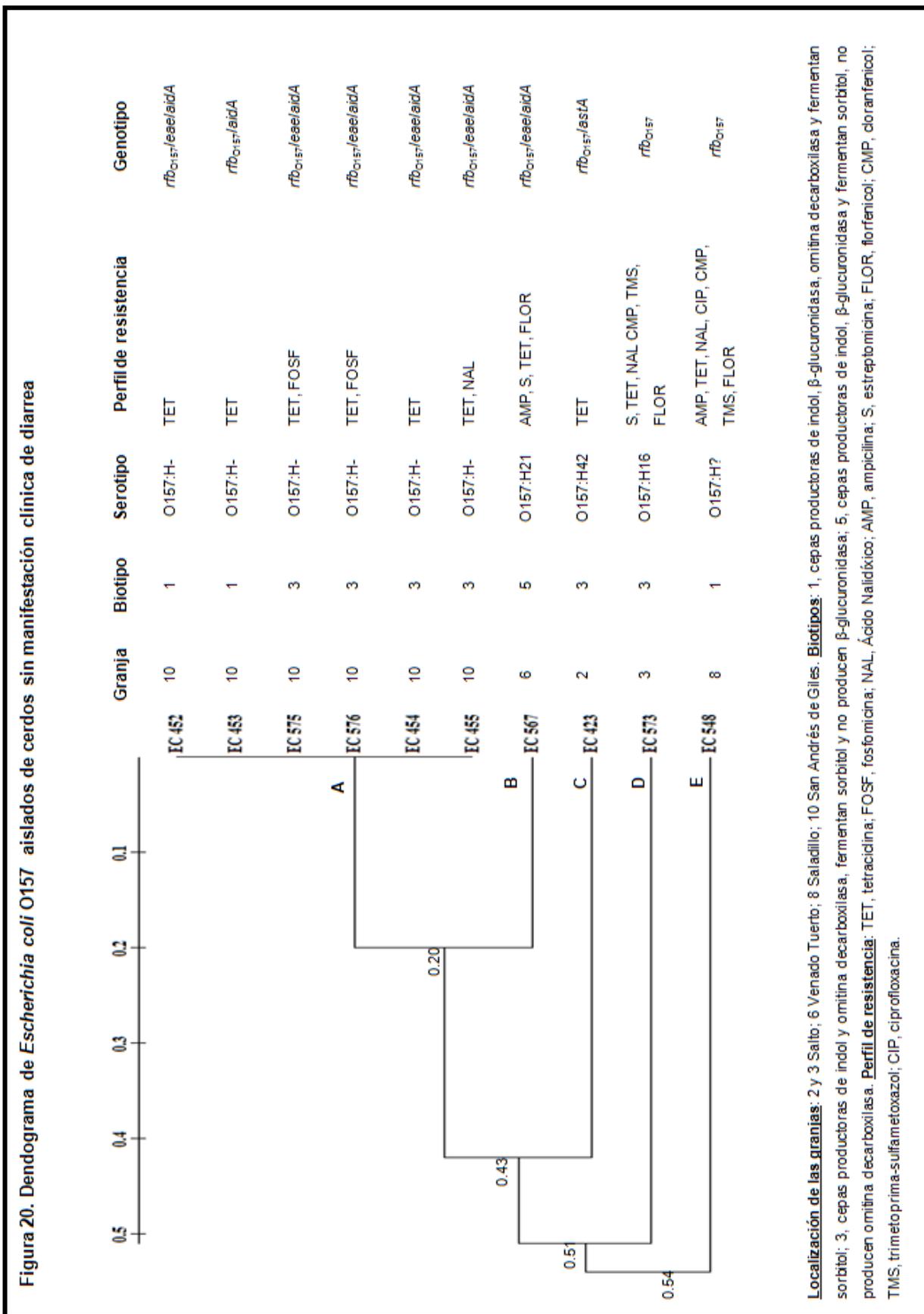
El patrón E, es el único aislamiento que corresponde a un animal del grupo M3 (21 días de vida) de la granja 8, localizada en el partido de Saladillo. Presenta 46 % de similitud con los patrones anteriores (A, B, C y D). Pertenece al biotipo 1, serotipo O157:H?, perfil de resistencia AMP, TET, NAL, CIP, CMP, TMS, FLOR; genotipo *rfb*<sub>O157</sub>.

La figura 20 corresponde al dendograma generado a partir de los patrones ERIC-PCR, incluyéndose origen, biotipo, perfil de resistencia antimicrobiana y genotipo de cada uno de los aislamientos.

**Imagen 13. Patrones ERIC-PCR de *Escherichia coli* O157 aislados de cerdos sin manifestación clínica de diarrea**



MTM: marcador de tamaño molecular Cien Marker. Líneas 2 - 5, 7 - 10, 12 y 13: *E. coli* O157



#### 4.4.6.4 ETEC serotipo O157

Sobre un total de 16 cepas de ETEC O157 analizadas, se establecieron seis patrones ERIC-PCR (A-F) con 45 % de similitud, los cuales presentaron entre 6 y 10 bandas en un rango comprendido entre 300 y 1500 pb aproximadamente (Imagen 14).

El patrón A, agrupó cinco ETEC (EC 447, EC 547, EC 571, EC 549 y EC 570), aislados a partir de distintos cerdos de 86 días de edad, provenientes de la granja 5 (localizada en Inés Indart). Estos aislamientos compartieron serotipo (O157:H19) y genotipo (*rfb<sub>O157</sub>/estIII/aidA*), mostrando diferencias entre ellos, a nivel de biotipo (3, 2 y 5) y perfil de resistencia antimicrobiana (TET, NAL; TET, FOSF; TET; TET, NIT, FOSF).

El patrón B agrupó dos ETEC O157 (EC 543 y EC 545), los únicos que no pertenecieron a la granja 5. En este caso, se aislaron de animales de 165 días de edad (M8), perteneciente a la granja 4, localizada en el partido de Chacabuco. La única diferencia observada entre ellos fue el patrón de resistencia antimicrobiana (TET, FLOR; TET). Compartieron biotipo (2), serotipo (O157:H19) y genotipo (*rfb<sub>O157</sub>/estIII/aidA/asta*). Entre los patrones A y B se observó 87 % de similitud.

El patrón C corresponde a EC 568, aislado del mismo cerdo que EC 570 incluido en el patrón A. Entre ellos se observó 83 % de similitud. La diferencia entre ellos se observó a nivel de perfil de resistencia (TET, NIT, FOSF; TET, FOSF).

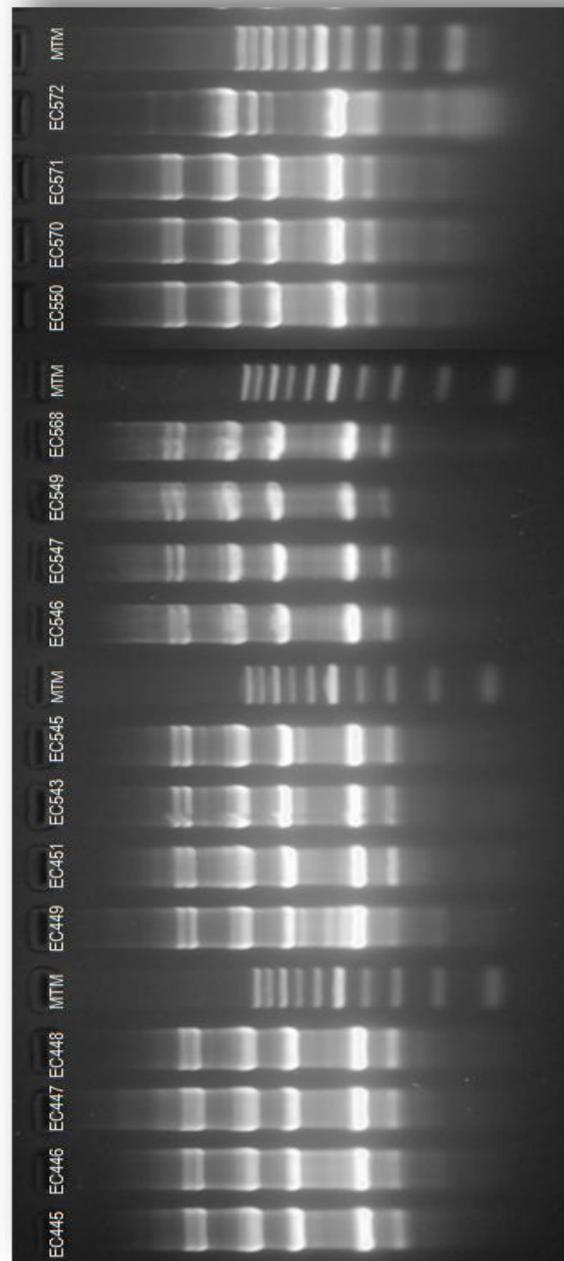
El patrón D agrupó seis ETEC (EC 546, EC 550, EC 445, EC 446, EC 448 y EC 451) aislados de animales pertenecientes al mismo grupo productivo y granja que las agrupadas en los patrones A, C, E y F.

Las cepas EC 447 y EC 448 están incluidas en los patrones A y D respectivamente y se aislaron del mismo animal, observándose entre ellas 79 % de similitud, diferenciándose en el biotipo (3 y 5) y perfil de resistencia antimicrobiana (TET, NAL; TET). EC 571 y EC

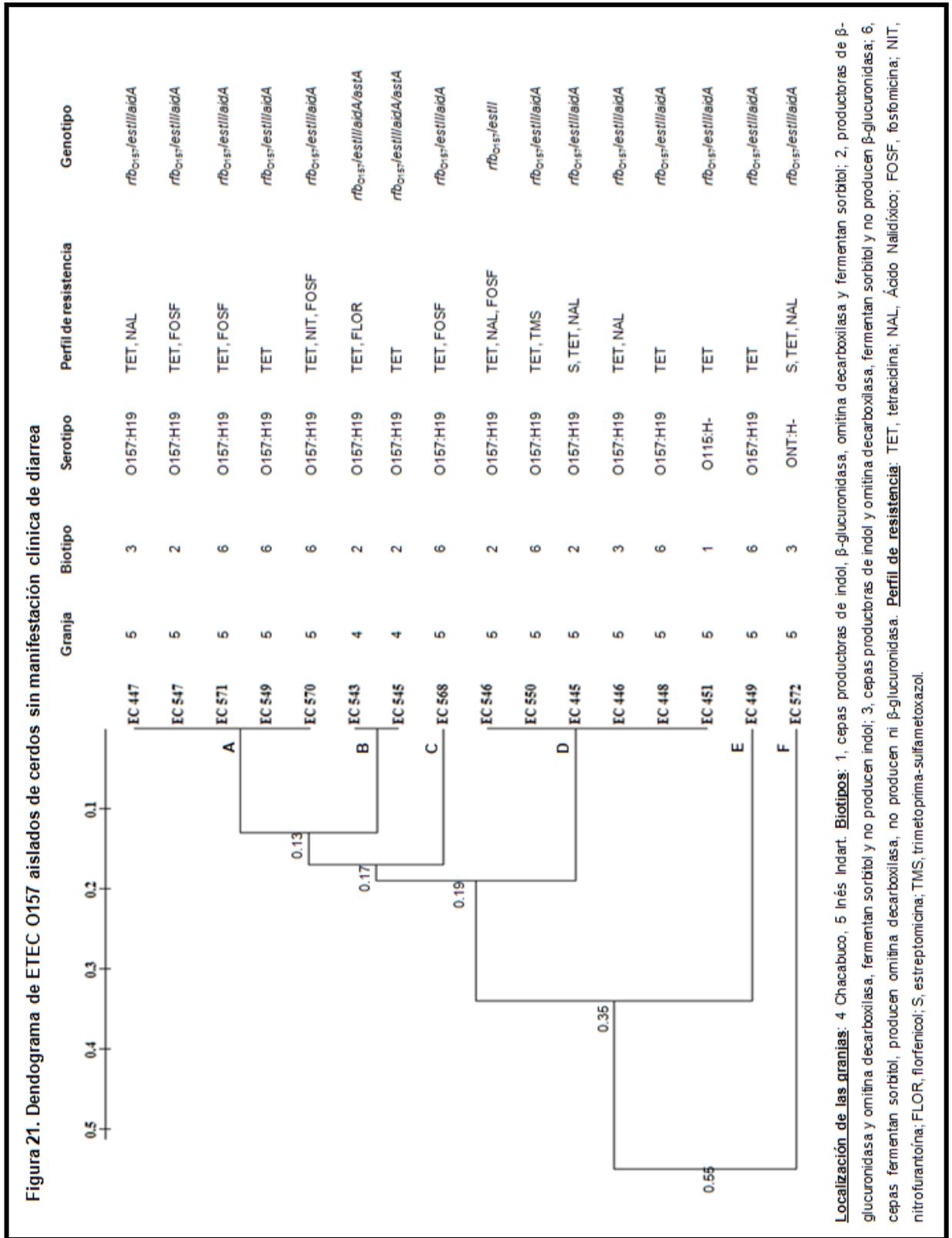
572, pertenecen a los patrones A y F respectivamente. Al igual que en el caso anterior, se aislaron de un mismo cerdo. El porcentaje de similitud es 45 %, y las diferencias son a nivel fenotípico: serotipo (O157:H19; ONT:H-) y resistencia antimicrobiana (TET, FOSF; S, TET, NAL). Otros ejemplos de ETEC O157 aislados a partir de un mismo animal son EC 549 (A) – EC 550 (D), difieren en perfil de resistencia (TET; TET, TMS); EC 451 (D) - EC 449 (E) presentan 65 % de similitud y difiere el serotipo (O115:H-; O157:H19) y EC 445 - EC 446. Estas últimas difieren con las demás, en que presentan 100 % de similitud (patrón D) pero difieren su biotipo (2 y 3) y perfil de resistencia antimicrobiana (S, TET, NAL; TET, NAL).

La figura 21 corresponde al dendograma generado a partir de los patrones ERIC-PCR, incluyendo el origen, biotipo, perfil de resistencia antimicrobiana y genotipo de cada uno de los aislamientos.

Imagen 14. Patrones ERIC-PCR de ETEC O157 aislados de cerdos sin manifestación clínica de diarrea



Líneas 1 -4, 6 -9, 11 -14, 16 -19: ETEC O157. MTM: marcador de tamaño molecular Cien Marker.



#### 4.4.6.5 ETEC

Por cuestiones relacionadas con el análisis de las imágenes, los ETEC se dividieron en dos grupos.

**1º grupo ETEC.** Sobre un total de 12 ETEC analizados, se establecieron 10 patrones ERIC-PCR (A-K) con 38 % de similitud, los cuales presentaron entre 6 y 15 bandas en un rango comprendido entre 80 y 1500 pb aproximadamente (Imagen 15a).

Los patrones A, B, C, D, F, G, H e I, pertenecen a un aislamiento cada uno, correspondientes a distintos cerdos de 86 días de vida (M6), de la granja 3 (Salto). Los patrones A (EC 440) y B (EC 557) presentan 82 % de similitud. Comparten el mismo biotipo (5), serotipo (O8:H-) y genotipo (*est//estII*) pero difieren en cuanto a su perfil de resistencia antimicrobiano (S, TET, CMP, TMS, FLOR; S, TET, NAL, CMP, TMS, FLOR). El patrón C (EC 441) corresponde a un aislamiento con 79 % de similitud con los anteriores, compartiendo biotipo, serotipo y genotipo, pero difiriendo también, su perfil de resistencia (S, TET, CMP, FLOR). Los patrones D y E presentan 77 % de similitud. Corresponden a aislamientos (EC 439 y EC 523) de diferentes granjas 3 y 6 respectivamente (Salto y Venado Tuerto). Comparten serotipo (O8:H-) y genotipo (*est//estII*) pero difieren su biotipo (5 y 1) y perfil de resistencia antimicrobiano (S, TET, NAL, CIP, CMP, FLOR; AMP, TET, TMS). El patrón F corresponde al aislamiento EC 436. Si bien su origen y sus características fenotípicas y genotípicas son exactamente iguales a EC 557 (granja 3, biotipo 5, serotipo O8:H-, perfil de resistencia antimicrobiana S, TET, NAL, CMP, TMS, FLOR; genotipo *est//estII*) presentan una similitud de sólo 68 %.

Entre los patrones G (EC 561) y H (EC 562) se observó una similitud de 71 % y 59 % con los patrones precedentes. Estos patrones corresponden a aislamientos provenientes de distintos animales de la granja 3 y grupo M6. Difieren entre ellos en todas las características fenotípicas y genotípicas analizadas: biotipo (1 y 5), serotipo (O149:H- y O8:H26), perfil de

resistencia antimicrobiano (S, TET, NAL, CMP, FLOR y S, ET, NAL, CMP, FLOR) y genotipo (*estII/estIII/fanC* y *estII/estII*).

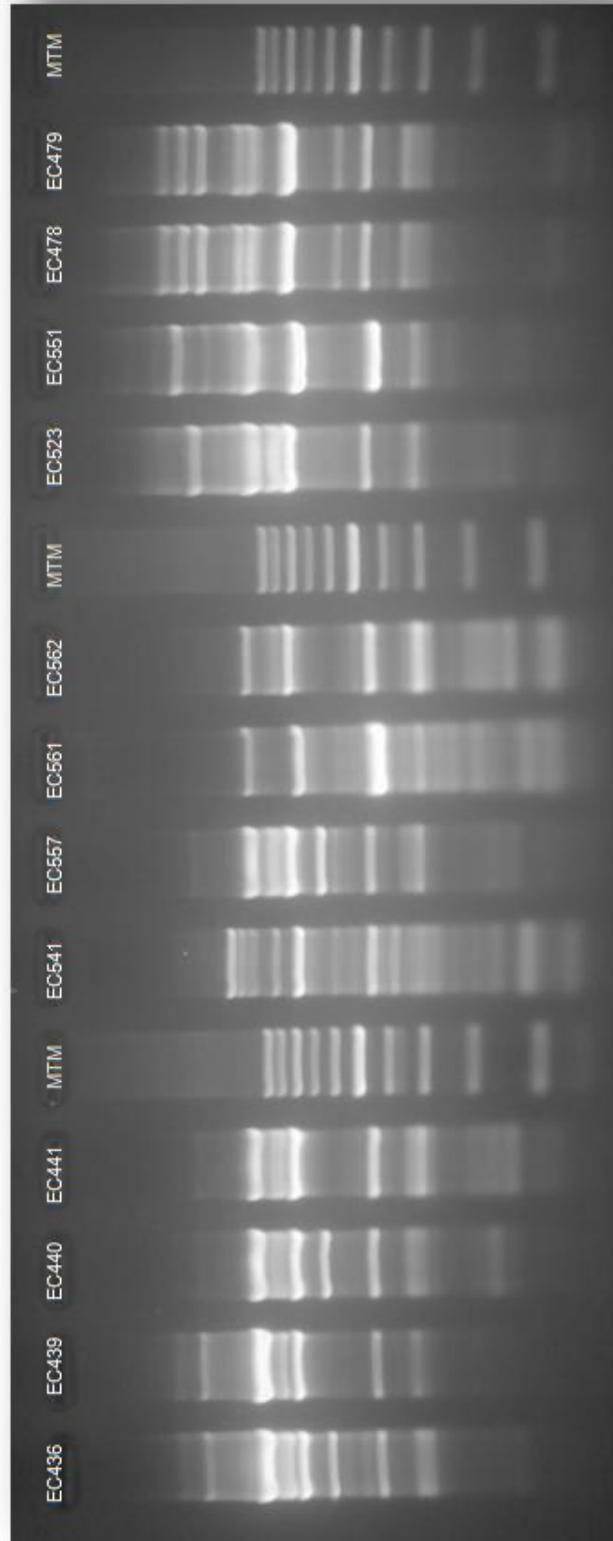
El patrón I (EC 541) presenta 53 % de similitud con el resto de los patrones precedentes y corresponde a un aislamiento obtenido a partir de un cerdo del grupo M6 de la granja 3, cuyo biotipo fue 1, serotipo O7:H16, perfil de resistencia S, TET, CMP, FLOR y genotipo *eltA/estIII/astA/aidA*.

El patrón J (EC 551) corresponde al único ETEC aislado en la granja 7 (Carmen de Areco) a partir de un animal del grupo M6. Presenta 46 % de similitud con los precedentes. Su biotipo es el 1, antígeno O no tipificable e inmóvil, resistente a tetraciclina y genotipo *estII/astA/fasA*.

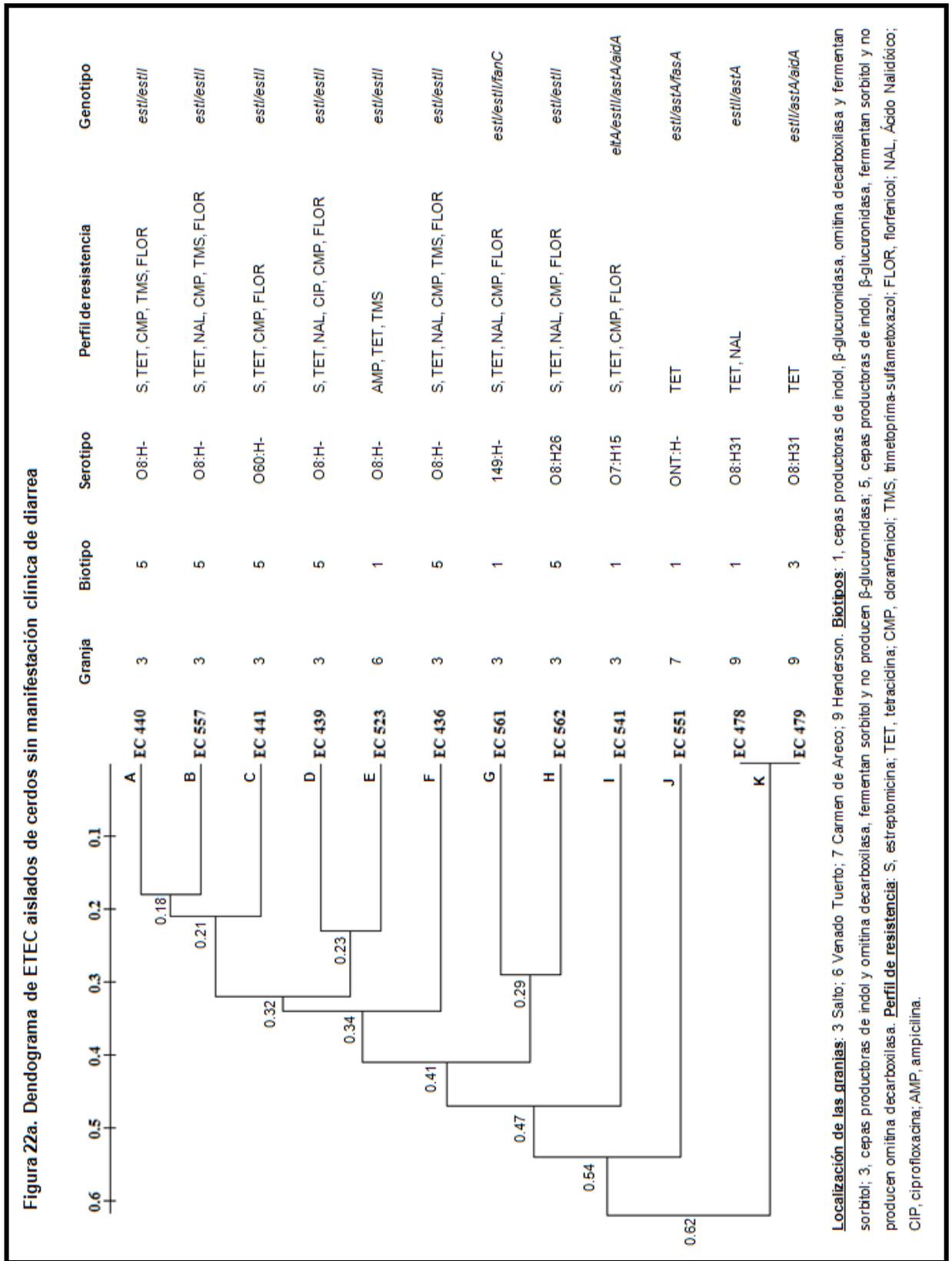
El patrón K agrupa dos aislamientos (EC 478 y EC 479) provenientes de un único animal del grupo M8 (165 días de vida), de la granja 9, pero que muestran diferentes biotipo (1 y 3), perfil de resistencia antimicrobiano (TET, NAL; TET) y genotipo (*estIII/astA* y *estIII/astA/aidA*).

La figura 22a corresponde al dendograma generado a partir de los patrones ERIC-PCR, incluyendo sé origen, biotipo, perfil de resistencia antimicrobiana y genotipo de cada uno de los aislamientos.

**Imagen 15a. Patrones ERIC-PCR de ETEC aislados de cerdos sin manifestación clínica de diarrea**

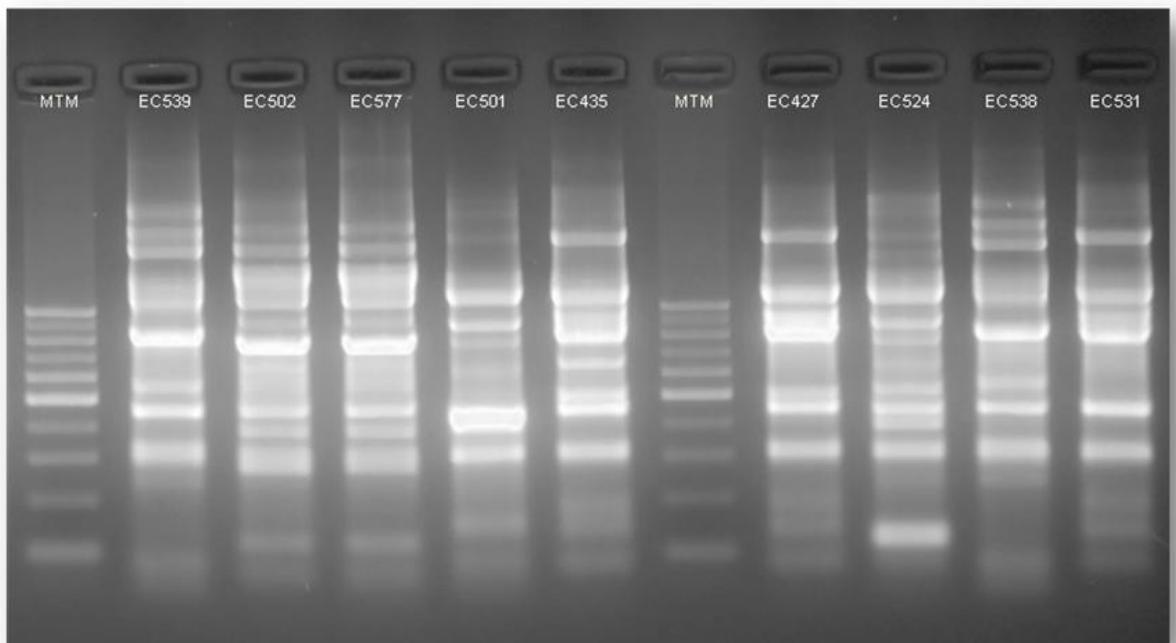


Líneas 1 -4, -9, 11 y 14: ETEC. MTM: marcador de tamaño molecular Cien Marker.



**2º grupo ETEC.** Sobre un total de nueve ETEC analizados, se establecieron nueve patrones ERIC-PCR (A-I) con 22 % de similitud, los cuales presentaron entre 8 y 13 bandas en un rango comprendido entre 90 y 1500 kb aproximadamente (Imagen 15b).

**Imagen 15b. Patrones ERIC-PCR de ETEC aislados de cerdos sin manifestación clínica de diarrea**



MTM: marcador de tamaño molecular Cien Marker. Líneas 2 - 6, 8 - 11: ETEC.

Los patrones A (EC 435) y B (EC 427) corresponden a dos aislamientos provenientes de la granja 3, de dos cerdos del grupo M6 (86 días de vida). Entre ellas hay una similitud de 73 %. Comparten genotipo (*estII/estII*), pero sus características fenotípicas difieren (biotipo 5 y 1; serotipo O8:H- y O8:H26; perfil de resistencia antimicrobiano S, TET, NAL, CMP, TMS, FLOR y S, TET, CMP, FLOR).

El patrón C (EC 531) corresponde al único ETEC aislado a partir de un cerdo del grupo M6, de la granja 11, localizada en el partido de Pergamino. Tiene 60 % de similitud

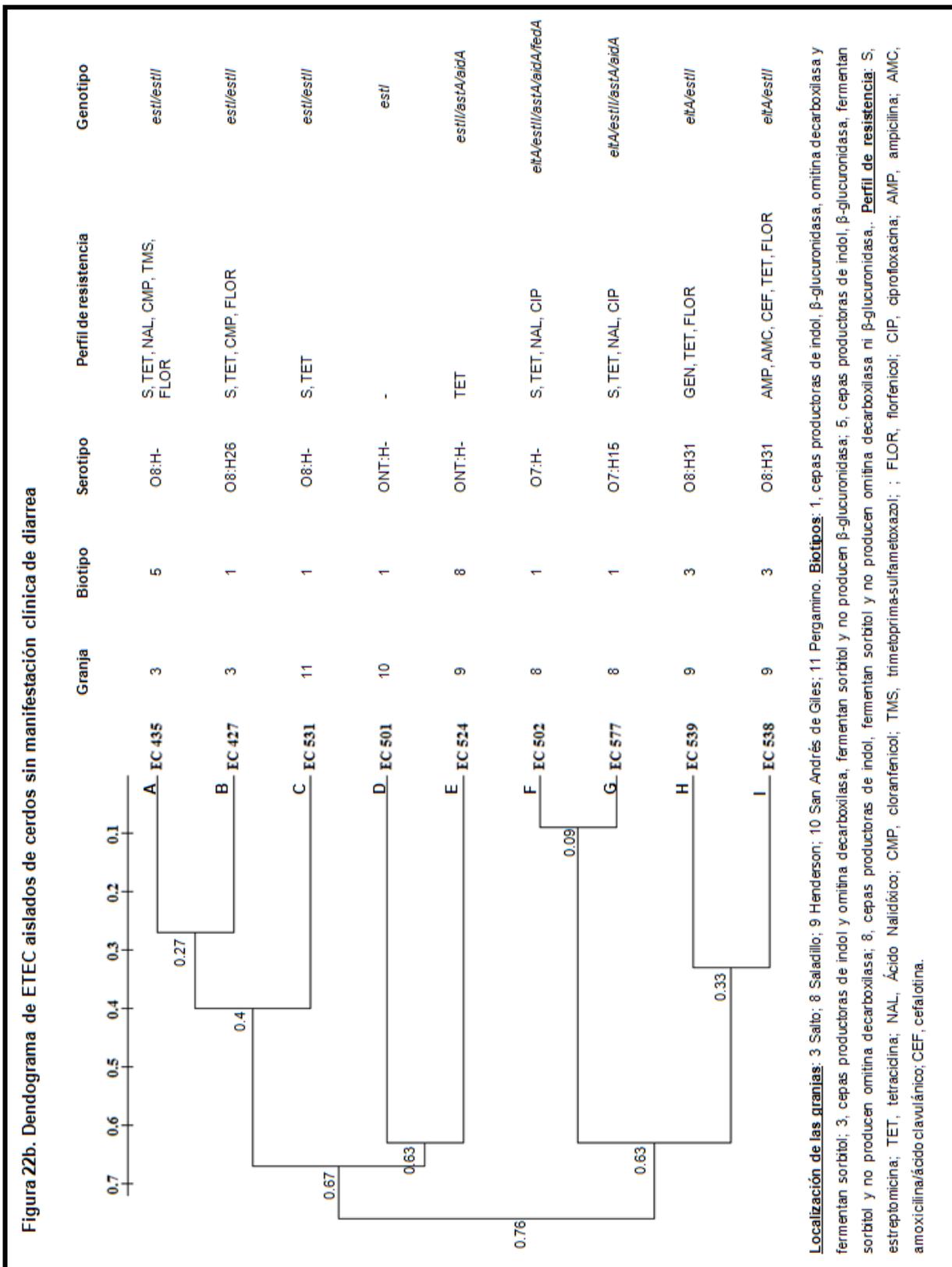
con las precedentes. Comparte con las anteriores el genotipo (*estII/estII*). Pertenece al biotipo 1, serotipo O8:H-, perfil de resistencia antimicrobiano S, TET.

El patrón D (EC 501) corresponde al único ETEC aislado a partir de un cerdo del grupo M3 (21 días de vida), de la granja 10, localizada en el partido de San Andrés de Giles. Tiene 33 % de similitud con las precedentes. Su genotipo es *estI*, pertenece al biotipo 1, antígeno O no tipificable e inmóvil, fue sensible a todos los antimicrobianos probados.

Los ETEC EC 502 y EC 577 pertenecen a los patrones F y G respectivamente, presentan 91 % de similitud. Ambos se aislaron de animales pertenecientes a la granja 8, EC 502 de un lechón de 21 días de vida (M3) y EC 577 de un animal del grupo M8 (165 días de vida). Comparten biotipo (1) y perfil de resistencia antimicrobiano (S, TET, NAL, CIP). Difiere su serotipo (O7:H- y O7:H16) y genotipo (*eltA/estIII/astA/aidA/fedA* y *eltA/estIII/astA/aidA*).

Los patrones E (EC 524), H (EC 539) e I (EC 538), corresponden a ETEC aislados a partir de animales de la granja 9 (Henderson). EC 524 se aisló de un animal del grupo M6 y mostró 22 % de similitud con EC 539 y EC 538 que se aislaron a partir de un mismo cerdo del grupo M8 (165 días de vida). EC 524 (E), pertenece al biotipo 8, antígeno O no tipificable e inmóvil, resistente a TET y genotipo *estIII/astA/aidA*. Los patrones H e I presentaron 67 % de similitud. Comparten biotipo (3), serotipo (O8:H31) y genotipo (*estII/estII*). Difieren en el perfil de resistencia antimicrobiano (GEN, TET, FLOR y AMP, AMC, CEF, TET, FLOR).

La figura 22b corresponde al dendograma generado a partir de los patrones ERIC-PCR, incluyéndose origen, biotipo, perfil de resistencia antimicrobiana y genotipo de cada uno de los aislamientos.



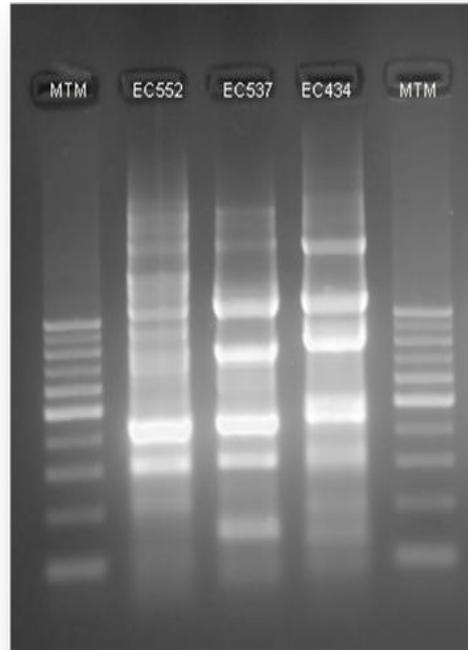
#### 4.4.6.6 ETEC portadores del gen *stx*<sub>2e</sub>

Sobre un total de tres ETEC portadores del gen *stx*<sub>2e</sub> analizados, se establecieron tres patrones ERIC-PCR (A-C) con 17 % de similitud, los cuales presentaron entre 8 y 10 bandas en un rango comprendido entre 180 y 1500 kb aproximadamente (Imagen 16).

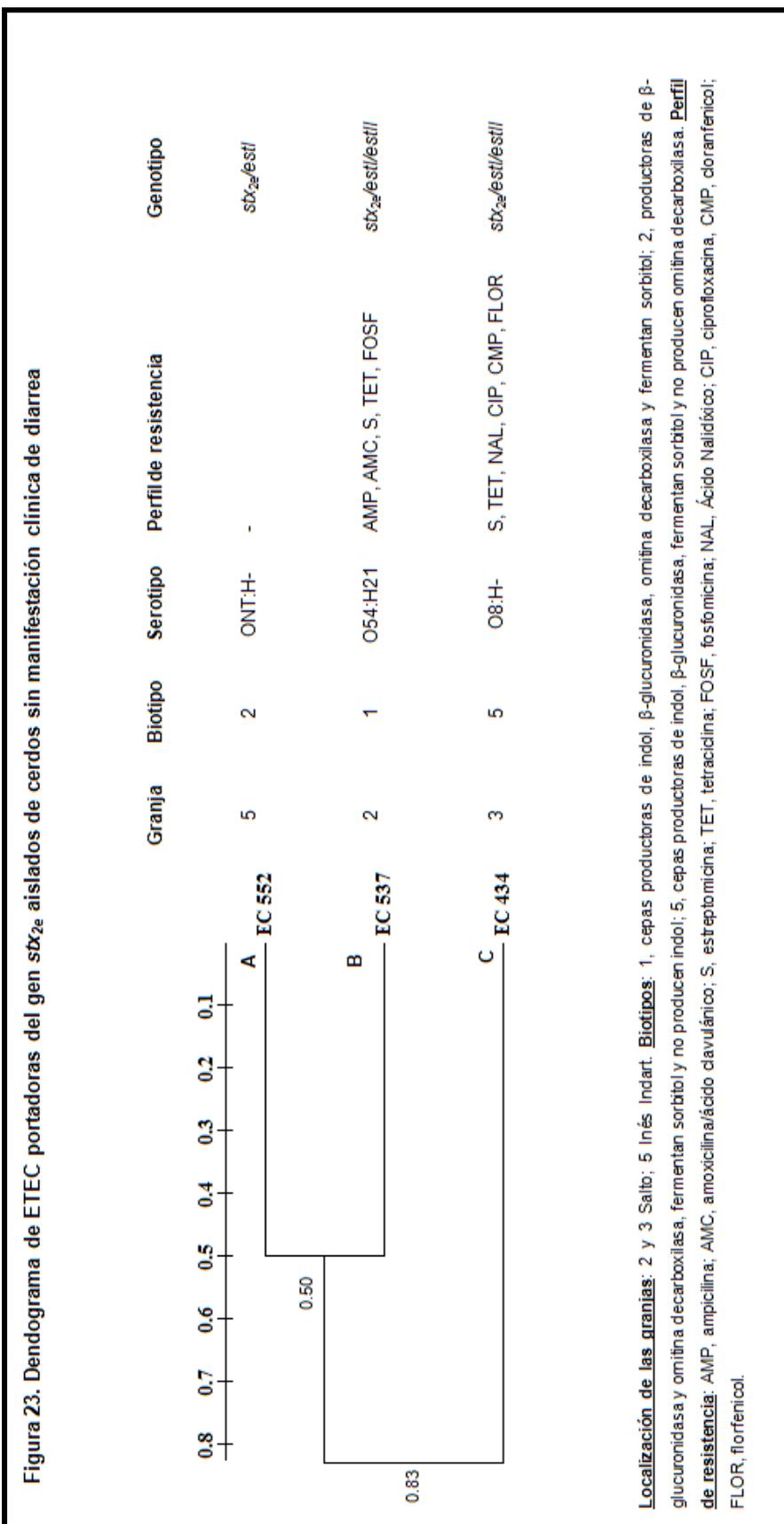
Los patrones A, B y C corresponden a aislamientos provenientes de tres cerdos de diferentes granjas 5, 2 y 3 respectivamente (Inés Indart y Salto). El patrón A corresponde EC 552, aislado a partir de un animal del grupo M6, perteneciente al biotipo 2, antígeno O no tipificable e inmóvil, sensible a todos los antimicrobianos probados cuyo genotipo es *est//stx*<sub>2e</sub>. El patrón B corresponde a EC 537, aislado de un animal del grupo M8. Presenta 50 % de similitud con el precedente. Pertenece al biotipo 1, serotipo O54:H21, perfil de resistencia antimicrobiano AMP, AMC, S, TET, FOSF, genotipo *est//est//stx*<sub>2e</sub>. El patrón C presenta 17 % de similitud con los precedentes, corresponde a EC 434, aislado de un animal del grupo M6, biotipo 5, serotipo O8:H-, perfil de resistencia antimicrobiano S, TET, NAL, CIP, CMP, FLOR. Tiene el mismo genotipo que el aislamiento EC 537.

La figura 23 corresponde al dendograma generado a partir de los patrones ERIC-PCR, incluyéndose origen, biotipo, perfil de resistencia antimicrobiana y genotipo de cada uno de los aislamientos.

**Imagen 16. Patrones ERIC-PCR de ETEC portadores del gen *stx*<sub>2e</sub> aislados de cerdos sin manifestación clínica de diarrea**



MTM: marcador de tamaño molecular Cien Marker. Líneas 2 - 4: ETEC portadores del gen *stx*<sub>2e</sub>.



#### 4.4.6.7 EAEC

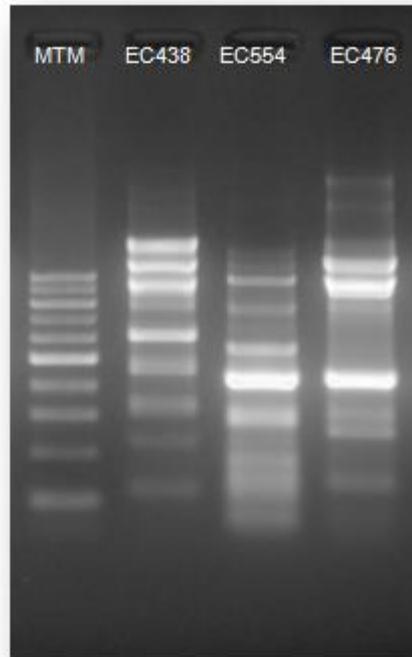
Sobre un total de tres cepas de EAEC analizadas, se establecieron tres patrones ERIC-PCR (A-C) con 17 % de similitud, los cuales presentaron entre 8 y 9 bandas en un rango comprendido entre 120 y 1500 kb aproximadamente (Imagen 17).

Los patrones A y C (EC 554 y EC 435) representan dos aislamientos procedentes de la granja 3 (Salto), de dos animales del grupo M6 (86 días de vida). Entre ellos presentan 17 % de similitud. Sólo comparten genotipo (*astA*), difieren en cuanto a su biotipo 1 y 4, serotipo O8/60:H23 y O20:H-, perfil de resistencia antimicrobiano S, TET, NAL, CIP, CMP, TMS, FLOR y S, TET, CMP, FLOR.

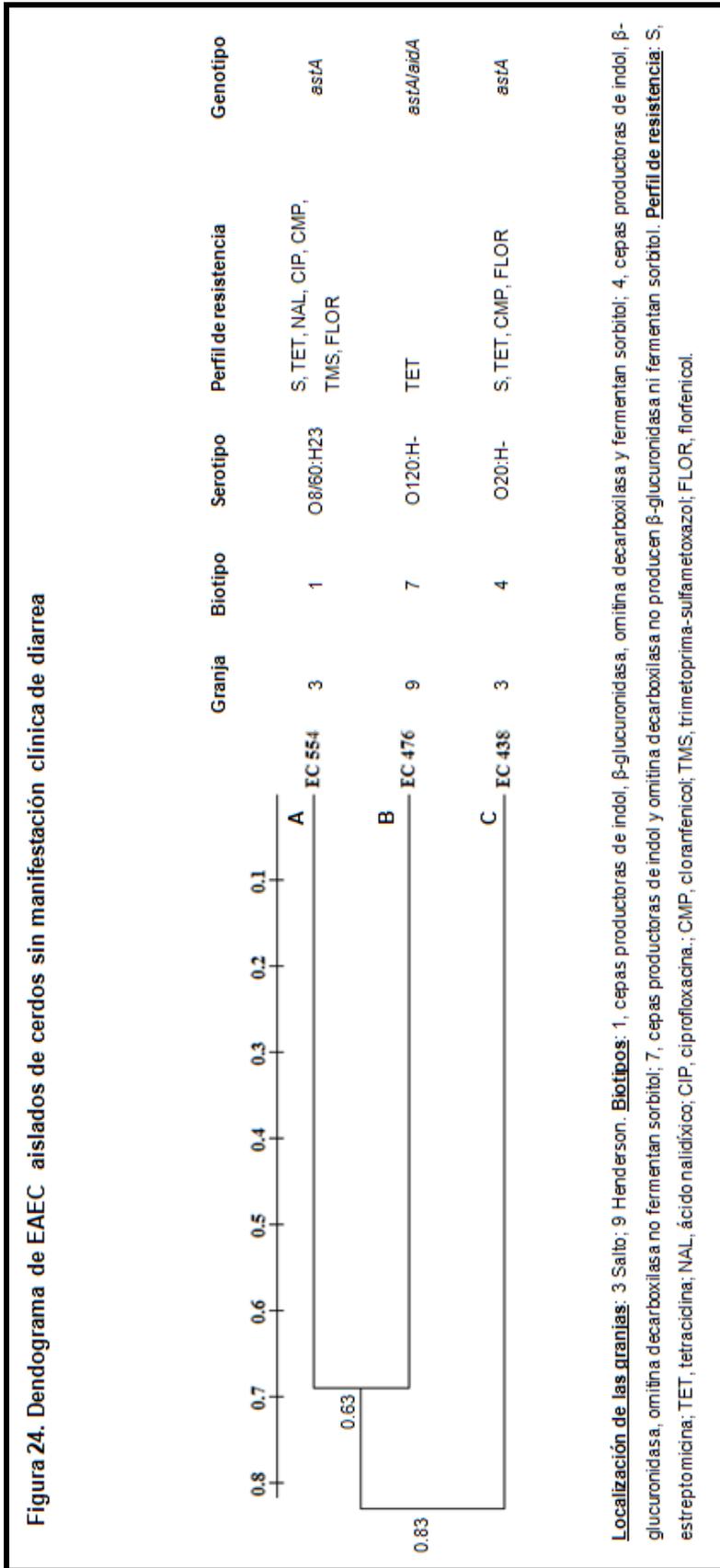
El patrón B (EC 476) corresponde a un aislamiento proveniente de la granja 9 (Henderson), de un animal del grupo M8. Presenta 37 % de similitud con el patrón A. Pertenece al biotipo 7, serotipo O120:H-, perfil de resistencia antimicrobiano TET y genotipo *astA/aidA*.

La figura 24 corresponde al dendograma generado a partir de los patrones ERIC-PCR, incluyéndose origen, biotipo, perfil de resistencia antimicrobiana y genotipo de cada uno de los aislamientos.

**Imagen 17. Patrones ERIC-PCR de EAEC aislados de cerdos sin manifestación clínica de diarrea**



MTM: marcador de tamaño molecular Cien Marker. Líneas 2 - 4: EAEC



#### 4.4.7 Poder discriminatorio de las pruebas de subtipificación fenotípicas y genotípicas

Según Hunter y Gaston (1988) el poder discriminatorio que debe presentar una técnica de subtipificación molecular debe ser al menos del 90 % ( $D= 0,9$ ). Para cumplir con el 5 % de probabilidad aceptable, el valor ideal de  $D$  debe ser  $> 0,95$ , aunque las técnicas de subtipificación que presentan un poder discriminatorio  $< 0,95$  pueden ser utilizadas en combinación con otras técnicas para lograr un valor de  $D= 0,95$ .

De los métodos de subtipificación fenotípica seleccionados, no se obtuvo valor de poder discriminatorio ideal para STEC, ETEC y *E. coli* O157 con ninguno de ellos. Con la serotipificación, los valores fueron: 90 %, 80 % y 77 % para STEC, ETEC y *E. coli* O157 respectivamente. Mientras que en la biotipificación los valores fueron de 60 % para STEC y *E. coli* O157 y 80 % para ETEC.

El poder discriminatorio de ERIC-PCR para STEC fue de 97 %, para ETEC de 96 % y para *E. coli* O157 de 66 %.

Los valores  $D$  para STEC y ETEC fueron ideales. No ocurrió lo mismo con el poder discriminatorio de ERIC-PCR para *E. coli* O157 ( $D= 0,66$ ). Si dentro de la categoría ETEC, analizamos los aislamientos pertenecientes al serotipo O157, el poder discriminatorio fue de 78 % (tabla 28).

**Tabla 28. Poder discriminatorio de las pruebas de subtipificación fenotípicas y genotípicas**

Prueba	Poder discriminatorio (%)		
	STEC	ETEC	<i>Escherichia coli</i> O157
Biotipificación	0,6 (60)	0,8 (80)	0,6 (60)
Serotipificación	0,9 (90)	0,8 (80)	0,77 (77)
ERIC-PCR	0,97 (97)	0,96 (96)	0,66 (66)

STEC: *Escherichia coli* productor de toxina Shiga. ETEC: *Escherichia coli* enterotoxigénico

## 5. DISCUSIÓN

Determinar la prevalencia de ETEC y STEC en cerdos sin manifestación clínica de diarrea, así como establecer el rol de esta especie de consumo humano como reservorio de las mismas, fue una de las motivaciones para el desarrollo de este trabajo. Dada la importancia que presentan estas categorías de *E. coli* tanto para la salud pública como animal, en este último caso debido a las grandes pérdidas económicas que generan, se dispone de información a nivel nacional (Notario y col., 2000; Parma y col., 2000b) e internacional (Blanco y col., 1997; Ríos y col., 1999; Frydendahl, 2002; Kwon y col., 2002; Bonardi y col., 2003; Botteldoorn y col., 2003; Fratamico y col., 2004; Chapman y col., 2006; Cheng y col., 2006; da Costa y col., 2006; Kaufmann y col., 2006; Khac y col., 2006; Schierack y col., 2006; von Müffling y col., 2007; Wu y col., 2007; Zhang y col., 2007; Madoroba y col., 2009).

Comparar los valores de prevalencia obtenidos entre los diferentes autores es dificultoso, debido a la heterogeneidad de las poblaciones analizadas o de las metodologías analíticas utilizadas. En algunos casos, la prevalencia de cerdos portadores de ETEC y STEC se obtuvo a partir de animales con signología clínica de diarrea o enfermedad de los edemas, en otros, difirió el origen de las muestras (hisopados rectales/materia fecal en granja o carcasa/contenido cecal en frigorífico), la edad de los animales muestreados, la metodología de procesamiento de las muestras.

Parma y col. (2000b), publicaron resultados obtenidos a partir de animales clínicamente sanos y con diarrea, enfermedad de los edemas o decaimiento generalizado. En contraposición con nuestros resultados, en los cerdos identificados como clínicamente sanos, no se detectaron animales portadores de los genes que caracterizan ETEC y STEC. Informaron los resultados de prevalencia a partir de los aislamientos provenientes de animales enfermos; cantidad de cerdos con diarrea a partir de los cuales se detectaron los genes: *stx*<sub>2all</sub> (5/127) y *stx*<sub>2e</sub> (3/127); cantidad de cerdos con decaimiento general a partir de

los cuales se detectaron los genes *stx*<sub>1</sub> (1/48), *stx*<sub>2all</sub> (5/48) y *stx*<sub>2e</sub> (3/48)). El gen que codifica la toxina STa se detectó en 27/127 (21,2 %) de los lechones con diarrea en comparación con el gen que codifica la toxina LT que fue detectado en el 3,1 % (4/127) de los aislamientos. La detección de genes de virulencia se realizó a partir cinco colonias características de *E. coli* seleccionadas al azar por cada animal. En un trabajo previo (Moredo y col., 1998), realizado con aislamientos de *E. coli* provenientes de cerdos con diarrea posdestete, se observó una prevalencia de 23 % ETEC/*estI* y 4 % de ETEC/*eltA*. Como punto en común entre el presente estudio y los dos mencionados, prevaleció el gen que codifica la toxina STa (12,6 %) sobre el que codifica LT (1,6 %). Osek (1999), analizó muestras de 46 cerdos clínicamente sanos, de aproximadamente 86 días de vida (M6) y encontró que, en coincidencia con este estudio, el 2,2 % de los animales poseían el gen que codifica LT mientras que el 2,2 % presentaban el gen que codifica STa y el 4,3 % el que codifica Stx2e. Estos últimos valores, difieren con nuestro trabajo ya que observamos en cerdos de la misma edad, que el 28 % eran portadores de *estI* y 12,2 % de *stx*<sub>2e</sub>.

En el marco de un programa nacional de monitoreo en Estados Unidos, Fratamico y col. (2004), detectaron los genes que codifican las toxinas Shiga en el 70 % de las muestras fecales provenientes de cerdos de 20 semanas de vida (*stx*<sub>1</sub>, 54 %; *stx*<sub>2</sub>, 64 %; 38 % ambos genes). En nuestro estudio, en los animales de la misma edad (aproximadamente 165 días) no se detectaron los genes *stx*<sub>1</sub> ni *stx*<sub>2</sub>. Sin embargo, se detectó el gen *stx*<sub>2e</sub> en el 7,8 % de los animales. Otra discrepancia se observó con respecto a los aislamientos pertenecientes al serogrupo O157. Fratamico y col. (2004), no detectaron animales portadores mientras que en nuestro trabajo, el 6,7 % de los cerdos fueron portadores del gen *rfb*<sub>O157</sub>, resultado similar al observado por Bonardi y col. (2003). Kaufmann y col. (2006), en Suiza, también obtuvieron el mismo resultado, aislamiento *E. coli* O157 no toxigénicos y cerdos portadores del *stx*<sub>2e</sub>. Botteldoorn y col. (2003), publicaron que en el 31 % de los animales muestreados detectaron el gen *stx*<sub>2e</sub> valor cuatro veces superiores al obtenido en el presente estudio (7

%) y que en el 30 % detectaron *E. coli* O157 no toxigénicos, valor que duplica nuestro hallazgo (12,3 %).

En el presente estudio, el gen *stx*<sub>2e</sub>, no se detectó en combinación con otros genes *stx*. Similar hallazgo fue informado por Beutin y col. (2008).

## SALUD PÚBLICA

STEC son considerados patógenos zoonóticos transmitidos por alimentos y agua que causan serios problemas en la salud pública, incluyendo brotes de SUH. Si bien el serotipo de STEC más comúnmente asociado con enfermedad en humanos es O157:H7, los serotipos reconocidos no-O157 que también pueden estar involucrados en procesos infecciosos son más de 100 (Coombes y col., 2011). De las cepas STEC aisladas a partir de hisopados rectales porcinos, siete portaron el gen *stx*<sub>1</sub> y 14 *stx*<sub>2</sub>, de las cuales 12 presentaron la variante *stx*<sub>2e</sub>. Los aislamientos STEC portadores de genes *stx*<sub>1</sub> y *stx*<sub>2</sub> porcinos (ONT:H<sup>-</sup>, ONT:H14 y ONT:H45), no pertenecieron a ninguno de los grupos descritos por Bettelheim (2007) como patógenos. Meichtri y col. (2004) y Hussein (2007) mencionan al ganado bovino como portador de STEC ONT:H14.

En nuestro estudio, en los STEC aislados, no se detectaron los genes que codifican factores de adhesión como intimina (*eae*) o la adhesina autoaglutinante de STEC (*saa*), estos resultados coinciden con los publicados por Zweifel y col. (2006). La mayoría de los STEC/*stx*<sub>1</sub>, presentaron la combinación de genes *stx*<sub>1</sub>/*ehxA*, difiriendo con lo propuesto por Naylor y col., 2005, quienes sostienen que sólo los aislamientos de ruminantes presentan el gen que codifica la enterohemolisina EhxA. Dean-Nystrom y col. (2003), observaron que la ausencia de intimina en STEC no-O157 tendría un bajo impacto en el desarrollo de la patogénesis de la enfermedad sistémica durante la infección por STEC en cerdos neonatos.

Considerando este hallazgo, los aislamientos STEC portadores de genes *stx*<sub>1</sub> o *stx*<sub>2</sub> de origen porcino, deberían ser considerados potencialmente patógenos para los humanos.

A diferencia de lo observado en Chile por Rios y col., (1999) y en Argentina por Notario y col., (2000), nuestros resultados indican que los cerdos no son el principal reservorio animal de EHEC, coincidiendo con la información publicada por Ferens y Hovde (2011).

Si bien el índice de recuperación promedio de STEC fue de 0,25, el rango fue de 0,16 a 0,7 dependiendo de los patotipos. Nuestro valor promedio es similar al citado por Botteldoorn y col. (2003) y Fratamico y col. (2004), quienes aislaron STEC a partir de un tercio de las muestras PCR-positivas. La principal diferencia se observó entre los índices de recuperación de STEC portadores de *stx*<sub>1</sub> y *stx*<sub>2</sub> (0,7) con respecto a STEC portadores de *stx*<sub>2e</sub> (0,2). Esto podría deberse a la cantidad de colonias que se repicaron en cada caso, con la finalidad de aislar la portadora de los genes en cuestión. Para la búsqueda de las colonias portadoras de los genes *stx*<sub>1</sub> y *stx*<sub>2</sub> se repicó un promedio de 250 colonias mientras que para el gen *stx*<sub>2e</sub>, se repicaron 60 colonias. Otra gran diferencia entre los autores citados y nuestro trabajo, se observa en la metodología utilizada en el procesamiento de las muestras.

En el presente estudio, se analizó un aislamiento bacteriano por muestra, salvo en aquellos casos en los cuales se observaron diferencias fenotípicas o genotípicas entre los aislamientos de una misma muestra. Éstos se enumeran a continuación: (1) EC 417 (*stx*<sub>2e</sub>/ONT) y EC 424 (*stx*<sub>2e</sub>/*aidA*, O36); (2) EC 430 (*stx*<sub>2e</sub>/*astA*, SOR-, ONT), EC 433 (*stx*<sub>2e</sub>/*astA*, SOR-, O20 ) y EC 435 (*estI*/*estII*, SOR+, O8); (3) EC 438 (*astA*, SOR-, O20), EC 439 (*estI*/*estII*, O8), EC 443 (*stx*<sub>2e</sub>/*astA*, SOR-, O20); (4) EC 445 (*rfb*<sub>O157</sub>/*estIII*/*aidA*, *idol*<sup>-</sup>, β-glucuronidasa<sup>+</sup>), EC 446 (*rfb*<sub>O157</sub>/*estIII*/*aidA*, *idol*<sup>+</sup>, β-glucuronidasa<sup>-</sup>); (5) EC 447 (*rfb*<sub>O157</sub>/*estIII*/*aidA*, *idol*<sup>+</sup>, β-glucuronidasa<sup>-</sup>), EC 448 (*rfb*<sub>O157</sub>/*estIII*/*aidA*, *idol*<sup>-</sup>, β-glucuronidasa<sup>-</sup>)

y EC 450 (*stx<sub>2e</sub>/astA*); (6) EC 449 (*rfb<sub>O157</sub>/estIII/aidA*, *idol*-,  $\beta$ -glucuronidasa-) y EC 451 (*rfb<sub>O157</sub>/estIII/aidA*, *idol*+,  $\beta$ -glucuronidasa+); (7) EC 547 (*rfb<sub>O157</sub>/estII, aidA*) y EC 552 (*stx<sub>2e</sub>/estI*); (8) EC 549 (TET) y EC 550 (TET, TMS); (9) EC 568 (TET, FOSF) y EC 570 (TET, NIT, FOSF); (10) EC 571 (TET, FOSF, *Indol*-,  $\beta$ -glucuronidasa-) y EC 572 (S, TET, FLOR, *Indol*+,  $\beta$ -glucuronidasa-); (11) EC 476 (*astA/aidA*), EC 477 (*stx<sub>2e</sub>*), EC 478 (*estIII/astA*) y EC 479 (*estIII/astA/aidA*); (12) EC 538 (AMP, AMC, CEF, TET, FLOR) y EC 539 (GEN, TET, FLOR). (13) EC 454 (TET) y EC 455 (TET, NAL); (14) EC 452 (*rfb<sub>O157</sub>/eae/aidA*) y EC 453 (*rfb<sub>O157</sub>/aidA*). Esta particularidad coincide con lo publicado por Schierack y col. (2006), quienes a partir de la determinación de genes de virulencia presentes en *E. coli* aislados a partir de cerdos clínicamente sanos observaron, en al menos seis muestras, la presencia de diferentes genotipos, variando entre tres y siete. Esta variabilidad podría explicarse como consecuencia de la alta tasa de transferencia horizontal de genes que puede observarse en la población de *E. coli* en el ambiente intestinal.

Los serogrupos de STEC/*stx<sub>2e</sub>*, coinciden en su totalidad con los publicados por Fratamico y col. (2004) en el marco de un monitoreo nacional de salud animal en Estados Unidos y parcialmente con Beutin y col. (2007) en Alemania. La mayoría de ellos se encuentran en la lista de serotipos informados menos de 30 veces a partir de pacientes humanos enfermos (Bettelheim, 2007). El impacto que puedan tener los aislamientos de origen porcino en los humanos es controversial. Sonntag y col. (2005), compararon aislamientos STEC/*stx<sub>2e</sub>*, provenientes de pacientes humanos con diarrea leve o asintomáticos frente a aislamientos de origen porcino con diarrea posdestete o enfermedad de los edemas, demostrando que estos aislamientos presentaban determinantes de virulencia específicos, los cuales les permitirían adaptarse a su hospedador definitivo, pudiendo desencadenar diferentes formas de enfermedad. Los resultados obtenidos por Beutin y col. (2008) sugieren que la toxina Stx<sub>2e</sub>, no tendría participación relevante como factor de patogenicidad para desencadenar diarrea y síndrome urémico hemolítico en

humanos. Sin embargo, Zweifel y col. (2006) sugieren que, a pesar de ser poco probable que los aislamientos de *E. coli/stx<sub>2e</sub>* ocasionen enfermedad severa en humanos, los cerdos clínicamente sanos no deben ser excluidos como potenciales reservorios de STEC/*stx<sub>2e</sub>*. Los aislamientos obtenidos en nuestro trabajo, carecieron de genes indicadores de patogenicidad para humanos (*eae*, *saa*, *ehxA*). La mayoría de ellos presentaron la combinación de genes indicadores de patogenicidad para el ganado porcino (*aidA*, *fedA* y *astA*).

En la actualidad, es discutible si los aislamientos de *E. coli* que tiene al menos un gen de virulencia, representan clones patógenos que perdieron otros genes o son comensales que están en proceso de adquisición (Chapman y col., 2006). La afirmación que la diferencia entre *E. coli* patógenos y comensales es la presencia de genes asociados con la virulencia, fue rebatida por Schierack y col. (2006), quienes demostraron que cerdos clínicamente sanos, son portadores de gran cantidad de genes de virulencia no asociados a patogenicidad; lo mismo observaron con respecto a la actividad hemolítica. Sugieren que para verificar la virulencia de un clon de *E. coli* como agente etiológico de una enfermedad y realizar la distinción entre clones comensales y patógenos, se requiere de otros enfoques incluyendo la determinación de la relación entre el aislamiento de *E. coli* analizado con respecto al total de la población intestinal.

Nuestros hallazgos coinciden con lo postulado por Gyles (2007) y Kaufmann y col. (2006), quienes describen que en el ganado porcino es frecuente el aislamiento de *E. coli* O157 con antígeno flagelar no H7 y Stx-negativos. EHEC O157:H7/H<sup>-</sup> (inmóviles) se encuentran dentro las causas más importantes de enfermedades transmitidas por alimentos (Karch y col., 2005). Un modelo evolutivo por etapas, postula que el grupo clonal O157 se dividió en un linaje principal O157:H7 sorbitol negativo y una rama secundaria de cepas O157:H<sup>-</sup> sorbitol positiva (Stephan y col., 2009). Friedrich y col. (2007), compararon la

prevalencia de *E. coli* O157 *stx*-negativas fermentadoras y no fermentadoras de sorbitol (SF y nSF), aisladas de materia fecal de pacientes con diarrea esporádica o SUH. Observaron que la proporción de aislamientos SF O157:H<sup>-</sup> fue significativamente más alto que nSF O157:H7/H<sup>-</sup>, 12,7 % y 0,8 % respectivamente. Estos mismos autores identificaron cepas *E. coli* O157 SF *stx*-negativas, de materia fecal de pacientes humanos, durante tres brotes de SUH y uno de diarrea, documentando la pérdida de los genes *stx* durante el transcurso del brote (Bielaszewska y col., 2006; Lee y Choi, 2006; Orth y col., 2006; Friedrich y col., 2007; Stephan y col., 2009 Lefebvre y col., 2010). Por otro lado, a diferencia de lo que ocurre con el ganado bovino, ovino y lechones, la adhesina intimina no es necesaria para que *E. coli* O157:H7 persista su colonización en cerdos mayores de 12 semanas (Jordan y col., 2005) y se mantiene viable en la materia fecal de los porcinos durante más de 21 días (Williams y col., 2008).

Desde el punto de vista de la salud pública es importante considerar que en la población de riesgo (M8), sólo se detectaron *E. coli* O157:H9 no productores de toxina Shiga. Este hallazgo es interesante, ya que un producto o subproducto alimenticio elaborado con carne de cerdo podría estar contaminado con *E. coli* O157:H9 no toxigénico. En este caso todos los métodos rápidos de detección inmunológica que tienen como blanco el LPS O157 van a dar resultado positivo. Los resultados positivos si no son confirmados pueden ocasionar el decomiso de estos productos y subproductos alimenticios ocasionando pérdidas económicas a los elaboradores. Es por ello que se recomienda la confirmación de todos los resultados positivos obtenidos con métodos rápidos de detección de O157 (USDA 2010).

## SANIDAD ANIMAL

Desde el punto de vista de la sanidad animal, la presencia de los genes *stx<sub>2e</sub>*, *eltA* y *estI* en las categorías M6 y M8, carecen de importancia clínica, ya que no es edad susceptible de padecer diarrea neonatal, diarrea posdestete o enfermedad de los edemas. La prevalencia del gen *eltA*, se mantuvo constante en el transcurso de las diversas etapas: 1,8 %, 1,5 % y 1,8 % en M3, M6 y M8, respectivamente. La diferencia se observó con la prevalencia del gen *estI*: 4,3 %, 28 % y 5,4 % en M3, M6 y M8, respectivamente. El incremento encontrado, no estuvo relacionado con el incremento de signos clínicos.

*E. coli* con actividad hemolítica, son habitantes habituales del intestino de cerdos clínicamente sanos y con diarrea (Chapman y col., 2006; Schierack y col., 2006; Schierack y col., 2011) y a menudo no poseen genes asociados a virulencia, típicos de aislamientos de patógenos intestinales como *estI*, *estII*, *eltA* y *faeG* habitualmente vinculados a ETEC, y los genes *stx<sub>2e</sub>* y *fedA*, característicos de los *E. coli* productores de enfermedad de los edemas (Schierack y col., 2011). Según Frydendahl (2002), la expresión de la hemolisina y la actividad hemolítica están relacionadas con la patogenicidad de *E. coli*. Casi todos los aislamientos provenientes de cerdos con diarrea neonatal o diarrea posdestete son hemolíticos, siendo esta característica un importante marcador para la detección de este patógeno en el diagnóstico de laboratorio. En contraposición, a este concepto, Schierack y col. (2006) postularon que la actividad hemolítica de los clones de *E. coli* por sí misma, no es evidencia suficiente para establecer la patogenicidad de estos aislamientos. En el presente estudio sólo tres aislamientos presentaron actividad hemolítica: dos STEC portadores del gen *stx<sub>2e</sub>* (ONT:H17 y ONT:H<sup>-</sup>) y un EAEC (O120:H<sup>-</sup>). El gen que codifica la hemolisina está localizado en un plásmido conjuntamente con los genes que codifican la adhesina fimbrial F18 y enterotoxinas (Fekete y col., 2002). Por lo cuál las cepas pueden perder esta habilidad, no pudiendo ser detectada, vale decir, no debería utilizarse como

indicador primario de virulencia en la rutina de los laboratorios de diagnóstico microbiológico (Frydendahl, 2002).

Los serogrupos de STEC/*stx*<sub>2e</sub>, detectados en el presente estudio no son los que están frecuentemente asociados con la diarrea posdestete o enfermedad de los edemas (O138, O139, O141, O149) (Osek, 2000a).

Serogrupos específicos de ETEC a menudo están asociados con grupos particulares de genes de virulencia, con una mayor variación entre los genes que codifican toxinas más que en los que codifican fimbrias. Clones diferentes dentro de un serogrupo, pueden haber evolucionado a través de la adquisición de diferentes genes de virulencia, produciendo una variación clonal asociada a una región o país en particular (Fairbrother y col., 2005).

De los 40 ETEC aislados, 36 pudieron ser seroagrupados mientras que sólo 4 se clasificaron como no tipificables. Frydendahl, 2002, publicó otros serogrupos asociados con DPD y EE, los cuales se observan con diversa frecuencia (O8, O45, O138, O139, O141, O147, O157). El serotipo ETEC que se observó con mayor frecuencia fue O157:H19 (16/40), según Bertschinger y Fairbrother (1999) y Fairbrother y col. (2005) es uno de los descritos con mayor asiduidad como causante de diarrea neonatal porcina, DPD y EE. En segundo lugar, se encontró el serogrupo O8 en 35 % (14/40) de los aislamientos, combinado con tres antígenos H diferentes: O8:H31 (4), O8:H26 (2), O8:H21 (1) y O8:H<sup>-</sup> (7). El serogrupo 8 está descrito dentro de los asociados a diarrea neonatal porcina y DPD (Frydendahl, 2002; Fairbrother y col., 2005). Los restantes ETEC pertenecieron a los serotipos O7:H15, O7:H<sup>-</sup>, O115:H<sup>-</sup> (en coincidencia con Frydendahl, 2002); O54:H21 y O60:H<sup>-</sup> serogrupos no asociados con diarrea o enfermedad de los edemas, aunque este último está mencionado dentro los asociados con septicemia (Bertschinger y Fairbrother, 1999). El serogrupo predominante de *E. coli*, a nivel mundial, asociado con DPD es O149 (Fairbrother y col., 2005). En el presente estudio, sólo un aislamiento de ETEC (*estII/estIII/fanC*) perteneció a

este serogrupo, siendo un microorganismo inmóvil (O149:H<sup>-</sup>). Yamamoto y Nakazawa, en 1997, describieron ETEC con similares características. El 94 % (34/36) de los ETEC serotipificables aislados de cerdos sin manifestación clínica de diarrea, pertenecieron a serotipos asociados con diarrea neonatal porcina, diarrea posdestete o enfermedad de los edemas.

Ubicándose bajo la premisa que, para que *E. coli* sea patogénico, se requiere de múltiples factores (Schierack y col., 2006), y considerando los resultados obtenidos con aislamientos provenientes de cerdos con DPD o EE, por Frydendahl (2002) y datos propios (2012), la presencia de adhesinas fimbriales (y no fimbriales) y toxinas están correlacionadas con la patogenicidad de *E. coli* en cerdos. En el presente estudio, sólo el 5,4 % (4/74) de los aislamientos presentaron los genes que codifican las adhesinas fimbriales F5, F6 y F18. El 42 % (31/74) de los *E. coli* toxigénicos aislados, eran portadores del gen *aidA*.

Coincidiendo una vez más con los postulados realizados por Schierack y col. (2006), y considerando que los ETEC analizados se aislaron de cerdos sin manifestación clínica de diarrea, se podría sugerir que los genes de virulencia presentes en estos microorganismos, no se estarían expresando o lo estarían haciendo débilmente, por lo cual la capacidad de éstos para causar enfermedad estaría suprimida. Otra opción sería que estos aislamientos de *E. coli* representan una pequeña fracción del total de la microflora intestinal. En tercer lugar, el hecho que la mayoría de los *E. coli* toxigénicos analizados carecen de las principales estructuras de adhesión fimbriales, por lo cual a pesar de estar presentes en el contenido intestinal, no serían capaces de adherirse a la mucosa intestinal y desencadenar la patogenia típica de estas bacterias. Sin embargo, si consideramos los resultados obtenidos por Harel y col. (1991) y por Ravi y col. (2007), quienes informan que cepas ETEC sin adhesinas fimbriales F4, F5, F6 y F41 producen diarrea en lechones deberíamos

desestimar la tercer hipótesis planteada. En este sentido, Ravi y col. (2007), demostraron que la expresión de AIDA-I es esencial para que se produzca la colonización intestinal, autoagregación bacteriana *in vitro* y formación de biofilm. De esta manera, AIDA-I puede considerarse un determinante de virulencia significativo en lechones, para el desarrollo de la diarrea causada por *E. coli* porcinos diarreigénicos AIDA-I+.

Choi y col., (2001), sugieren que los *E. coli* portadores del gen *astA* deberían ser objeto de estudio considerando que pueden representar un determinante adicional en la patogénesis de la diarrea en cerdos. Para hacer esta afirmación, se basan en la alta prevalencia de *E. coli/astA* aislados de cerdos con diarrea posdestete o enfermedad de los edemas (31,3 %). Nuestros resultados difieren con los de Choi y col. (2001), en 7 %, pero cabe resaltar que ellos analizaron aislamientos provenientes de animales con signología clínica y en este trabajo, el estudio se realizó a partir de cerdos sin manifestación clínica de diarrea o enfermedad de los edemas. De los 74 aislamientos analizados, 18 mostraron ser portadores del gen *astA* (24,3 %). Su distribución dentro de las diferentes categorías fue 22,5 % (9/40) de los ETEC y 41,6 % (5/12) de STEC %. Los cuatro aislamientos faltantes se clasificaron como EAEC ya que presentaron como único marcador de virulencia al gen *astA*. Estos resultados no coinciden con los obtenidos por Ngeleka y col., 2003, quienes observaron que el 40 % de los aislamientos analizados presentaron el gen *astA*, sólo o combinado con otros genes codificadores de toxinas (13,5 %), adhesinas fimbriales y no fimbriales. Ngeleka y col. (2003) están en desacuerdo con la opinión de Choi y col. (2001), manifestando que como el gen *astA* se detectó en similar proporción en aislamientos provenientes de lechones diarreicos y no diarreicos, dada la situación que este gen se encuentra como único marcador de virulencia, es probable que su expresión sea insuficiente para causar diarrea. Analizando los resultados del presente trabajo, se observa que el 77,8 % de los aislamientos portadores del gen *east1*, lo hicieron en combinación con con otros genes, claramente indicadores de patogenicidad: en STEC: *stx<sub>2e</sub>/astA/aidA* (1), *stx<sub>2e</sub>/astA* (4)

y ETEC: *estIII/astA/aidA* (4), *eltA/estIII/astA* (1), *estIII/astA/fasA* (1), *estIII/astA* (1), *eltA/estIII/astA/aidA* (1) y *eltA/estIII/astA/aidA/fedA* (1). Por lo que, mediante esta observación, y en función de lo postulado por Ngeleka y col. (2003) y ya previamente enunciado, puede deducirse el potencial patógeno de nuestros aislamientos. Zajacova y col., 2012 encontraron una alta asociación entre el gen *astA* y *eltA*; mientras que Choi y col. (2001) lo hicieron entre los genes *astA* y *estI*. Los resultados obtenidos por estos autores no se relacionan con los nuestros, ya que la fuerte asociación que observamos fue entre los genes *estIII* y *astA*. Otra asociación que se realiza es entre los aislamientos *astA* positivos con adhesinas fimbriales y no fimbriales, con respecto a los aislamientos *astA* positivos sin ningún tipo de adhesinas. En contraposición con los resultados informados por Frydendahl y col., 2002; Osek y col., 2003a, Lee y col., 2008 y Zajacova y col., 2012, nuestros aislamientos *east1* positivos no estuvieron asociados con los genes que codifican las adhesinas fimbriales F4, F5 y F41 y las no fimbriales *paa* e *intimina* (Leclerc y col., 2007; Zhang y col., 2007). Un aislamiento presentó el gen que codifica la fimbria F6 y otro el gen que codifica F18. Lo que sí se pudo reconocer, fue la clara asociación con el gen *aidA*, observándose en el 44 % (8/18) de los aislamientos. Nuestros resultados coinciden con la información publicada por Dubreuil (2010) que describe, a partir de una revisión bibliográfica, la aparición de un subgrupo de ETEC porcinos, negativos para las adhesinas fimbriales clásicas pero que expresan la adhesina no fimbrial involucrada en la adherencia difusa (AIDA). Recientemente, Ravi y col. (2007), establecieron claramente la importancia de la adhesina AIDA-I en conjunción con la producción de la toxina STb en el desarrollo de la diarrea porcina. Dubreuil (2010) sugiere que la asociación STb/AIDA podría ser el eslabón perdido en la información acerca de la colibacilosis porcina. Las similitudes observadas entre AIDA-I de origen humano y porcino, podría representar un potencial riesgo de infección cruzada entre los humanos y los cerdos. Esta infección, muy probablemente podría ser adquirida como una zoonosis, luego de la diseminación de la bacteria por su hospedador.

Chapman y col. (2006) a partir de su trabajo realizado con aislamientos provenientes de cerdos con diarrea y clínicamente sanos, demostraron que los genes presentes no pueden definir con claridad cada categoría de *E. coli* diarreigénicos. Determinaron que la presencia de genes de virulencia para humanos, en aislamientos de *E. coli* porcinos, no debería ser interpretado como un proceso de transferencia activa de genes. En cambio, sus cambios sugieren que tanto los aislamientos comensales y clínicos porcinos, durante años adquirieron y mantuvieron estos genes como parte de su mecanismo de supervivencia generando una gran diversidad genética y por lo tanto incrementando su capacidad para sobrevivir en el hospedador animal.

Schierack y col. (2006), concluyen que los aislamientos de *E. coli* portadores de genes de virulencia, pero aislados a partir de animales sin signología clínica, deben considerarse flora normal hasta tanto desencadenen un proceso infeccioso.

## ANTIMICROBIANOS

Como consecuencia del incremento en la utilización de antimicrobianos, la emergencia de la resistencia se transformó en un problema de índole mundial que afecta la salud pública y animal. Debido a ello, en numerosos países se implementaron programas de vigilancia y monitoreo de resistencia antimicrobiana. En Argentina, si bien aún no se desarrolló ningún programa con estas características para aislamientos de origen animal, hay publicaciones previas, acerca del comportamiento de *E. coli* aislados de cerdos clínicamente sanos como bacterias indicadoras de la flora intestinal normal, frente a diferentes antimicrobianos (Moredo y col., 2007; Pantozzi y col., 2010; Moredo y col., 2010). Se observa en el transcurso del tiempo (año 2005, 2006, 2007 y 2010), que el comportamiento de los *E. coli* analizados frente a los diferentes antimicrobianos, en algunos casos cambió. En general, en la mayoría de los antimicrobianos analizados, se observó la disminución del porcentaje de resistencia.

Como ejemplo más notorio de esto, se puede mencionar el caso de la ampicilina, variando el porcentaje de resistencia en el transcurso de los años mencionados de la siguiente manera: 74 %, 53 % y 13,5 %. Una de las posibles explicaciones para justificar estas diferencias podría ser la presión de selección. Debido a la alta resistencia observada en los aislamientos del año 2005, el uso de ampicilina dejó de ser tan masivo, por lo cuál la resistencia disminuyó. Esta misma observación podría realizarse en relación a cefalotina, cuyos porcentajes de resistencia disminuyeron de la siguiente manera: 13 %, 4,6 % y 2,7 %. Con respecto a la cefotaxima y la cefoxitina los aislamientos mostraron ser sensibles, no observándose modificación en el transcurso del tiempo. Dentro del grupo de los beta-lactámicos, la gran diferencia se presentó con amoxicilina/ácido clavulánico, cuyo porcentaje de resistencia, aumentó de 0 a 6,9 %, probablemente como consecuencia de su incorporación al grupo de drogas utilizadas que en la actualidad se utilizan con fines terapéuticos o profilácticos. Otros antimicrobianos que disminuyeron su porcentaje de resistencia son los aminoglucósidos: gentamicina, ampicilina y estreptomycin. Con respecto a las quinolonas, con el ácido nalidíxico el porcentaje se mantuvo prácticamente igual (38 % en 2005 y 31 % en 2007) mientras que con ciprofloxacina se observó un claro aumento (2005: 14 %, 2007: 9,5 % y 2010: 51 %). En el año 2010 no se estudió el comportamiento de los aislamientos frente a ácido nalidíxico y ampicilina. Otro antimicrobiano con el cuál se observó aumento del porcentaje de resistencia fue florfenicol variando de 37,5 % en el 2007 a 47,6 en 2010. La tetraciclina, antimicrobiano ampliamente difundido dentro de las explotaciones porcinas a nivel mundial (Rosengren y col., 2009), mantuvo su porcentaje de resistencia en 93 % en el transcurso del tiempo. Con respecto al porcentaje de aislamientos multirresistentes, disminuyó el porcentaje entre los años 2005 y 2007 de 62 % a 42 %, respectivamente.

Si bien el análisis global de los porcentajes de resistencia obtenidos, indican el estado de situación a nivel general del grupo de granjas seleccionadas, evaluando los

resultados observados intra-granja, y de acuerdo con lo postulado por Rosengren y col. (2008), no deberían subestimarse los valores observados en particular, ya que el manejo que se realiza en cada granja en particular, se manifiesta en la aparición de resistencia antimicrobiana.

### SUBTIPIFICACION MOLECULAR

Existe una gran controversia acerca de las técnicas de subtipificación molecular para el estudio de las diferentes categorías de *E. coli*. Los valores de poder discriminatorio de ERIC-PCR, obtenidos para STEC y ETEC en el presente estudio, coinciden con los observados por Wieczorek y col., 2004 (D= 0,96), quienes determinaron la relación entre características fenotípicas y genotípicas de *E. coli* O149:K91, F4 aisladas a partir de cerdos con diarrea. Yuan y col. (2010) la citan como una técnica apropiada para estudiar la diseminación de *E. coli* a través de aerosoles desde el interior de los galpones de producción hacia el exterior de los mismos, inclusive zonas aledañas a las granjas. Resultado contrario obtuvieron Leung y col. (2004) quienes observaron que ERIC-PCR obtuvo un poder discriminatorio bajo para distinguir *E. coli* de origen bovino, humano y porcino.

En el presente trabajo, ERIC-PCR no mostró ser efectiva para discriminar entre aislamientos de *E. coli* O157, enterotoxigénicos y no toxigénicos, por lo cual debería utilizarse una combinación con otra técnica de subtipificación como PFGE.

Por otro lado, se demostró el valor de ERIC-PCR para complementar estudios epidemiológicos de ETEC y STEC. Sin embargo, sería apropiado evaluar otras técnicas para la subtipificación molecular de aislamientos de *E. coli* toxigénicos y no toxigénicos de origen porcino, entre las cuales podría incluirse PFGE o MLST.

## 6. CONCLUSIONES

- ✓ Los cerdos de la provincia de Buenos Aires sin signología clínica de diarrea son portadores de ETEC, STEC y EAEC.
- ✓ La prevalencia de ETEC y STEC, en los cerdos de la provincia de Buenos Aires, está asociada a la edad de los animales.
- ✓ Los cerdos de la provincia de Buenos Aires son portadores de *E. coli* O157 no toxigénicos.
- ✓ Los cerdos de la provincia de Buenos Aires son portadores de STEC no-O157.
- ✓ La mayoría de los STEC aislados de materia fecal porcina, poseen la variante *stx<sub>2e</sub>*.
- ✓ Los serotipos de ETEC aislados de cerdos de la provincia de Buenos Aires sin signología clínica de diarrea, están asociados a diarrea neonatal, diarrea posdestete o enfermedad de los edemas.
- ✓ Los serotipos de STEC aislados de cerdos de la provincia de Buenos Aires sin signología clínica de diarrea, no están asociados a diarrea neonatal, diarrea posdestete o enfermedad de los edemas.
- ✓ Los serotipos de STEC aislados de cerdos de la provincia de Buenos Aires sin signología clínica de diarrea, no están asociados a diarrea sanguinolenta o SUH.
- ✓ *E. coli* toxigénicos y *E. coli* O157 no toxigénicos presentan multirresistencia frente a los antimicrobianos frecuentemente utilizados en las explotaciones porcinas de la provincia de Buenos Aires.
- ✓ La biotipificación y serotipificación, no presentan poder discriminatorio apropiado para ser utilizados como métodos de subtipificación fenotípicos, para el estudio de STEC, ETEC, EAEC y *E. coli* no toxigénicos de origen porcino.

- ✓ ERIC-PCR es un método de subtipificación molecular rápido, económico y útil para el estudio de ETEC y STEC de origen porcino, aunque no resultó apropiado para el estudio de *E. coli* O157.
- ✓ ETEC aislados de cerdos sin manifestación clínica de diarrea en la provincia de Buenos Aires no están epidemiológicamente relacionados.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. Abaas S, Franklin A, Kuhn I, Orskov F, Orskov I. Cytotoxin activity on Vero cells among *Escherichia coli* strains associated with diarrhea in cats. *Am J Vet Res* 1989; 50: 1294-1296.
2. Adiri RS, Gophna U, Ron EZ. Multilocus sequence typing (MLST) of *Escherichia coli* O78 strains. *FEMS Microbiol Lett* 2003; 222: 199-203.
3. Amonsin A, Wellehan JFX, Li LL, Laber J, Kapur V. DNA fingerprinting of *Pasteurella multocida* recovered from avian sources. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 3025-3031.
4. An H, Fairbrother JM, Désautels C, Harel J. Distribution of a novel locus called Paa (porcine attaching and effacing associated) among enteric *Escherichia coli*. *Advance Exp Med Biol* 1999; 473: 179-184.
5. An H, Fairbrother JM, Désautels C, Mabrouk T, Dugourd, Dezfulian H, Harel J. Presence of the LEE (locus of enterocyte effacement) in pig attaching and effacing *Escherichia coli* and characterization of eae, espA, espB, and espD genes of PEPEC (pig EPEC) strain 1390. *Microbiol Pathog* 2000; 28: 291-300.
6. Barba J, Bustamante VH, Flores MA, Deng W, Finlay BB, Puente JL. A positive regulatory loop controls expression of the locus of enterocyte effacement-encoded regulators Ler and GrlA. *J Bacteriol* 2005; 187: 7918-7930.
7. Batisson I, Guimond MP, Girard F, An H, Zhu C, Oswald E, Fairbrother JM, Jacques M, Harel J. Characterization of the novel factor paa involved in the early steps of the adhesion mechanism of attaching and effacing *Escherichia coli*. *Infec Inmun* 2003; 71: 4516-4525.
8. Bentancor A, Rumi MV, Gentilini MV, Sardoy C, Irino K, Agostini A, Cataldi A. Shiga toxin-producing and attaching and effacing *Escherichia coli* in cats and dogs in a high hemolytic uremic syndrome incidence region in Argentina. *FEMS Microbiol Lett* 2007; 267: 251-256.
9. Bertin Y, Martin C, Girardeau JP, Pohl P, Contrepois M. Association of genes encoding P fimbriae, CS31 A antigen and EAST1 toxin among CNF-producing *Escherichia coli* strains from cattle with septicemia and diarrhea. *FEMS Microbiol Lett* 1998; 162: 235-239.
10. Bertschinger HU, Fairbrother JM. *Escherichia coli* Infections. In: Straw BE, D'Allaire S, Mengling WL, Taylor DJ editors. *Diseases of Swine*. 8<sup>th</sup> ed. Iowa State University Press; 1999. p. 431-64.

11. Bettelheim KA. The Non-O157 Shiga-toxigenic (Verocytotoxigenic) *Escherichia coli*; underrated pathogens. Crit Rev Microbiol 2007; 33: 67-87.
12. Beutin L, Montenegro MA, Orskov I, Orskov F, Prada J, Zimmermann S, Stephan R. Close association of verotoxin (shiga like toxin) production with enterohemolysin production in strains of *Escherichia coli*. J Clin Microbiol 1989; 27: 2553-2561.
13. Beutin L, Geier D, Steinrück H, Zimmermann S, Scheutz F. Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-like toxin)-producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy domestic animals. J Clin Microbiol 1993; 31: 2483-2488.
14. Beutin L, Geier D, Zimmermann S, Karch H. Virulence markers of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* strains originating from healthy domestic animals of different species. J Clin Microbiol 1995; 33: 631-635.
15. Beutin L, Miko A, Krause G, Pries K, Haby S, Steege K, Albrecht N. Identification of human-pathogenic strains of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from food by a combination of serotyping and molecular typing of shiga toxin genes. Appl Environ Microbiol 2007; 73: 4769-4775.
16. Beutin L, Krüger U, Krause G, Miko A, Martin A, Strauch E. Evaluation of major types of Shiga toxin 2e-producing *Escherichia coli* bacteria present in food, pigs and the environment as potential pathogens for humans. Appl Environ Microbiol 2008; 74: 4806-4816.
17. Bielaszewska M, Prager R, Zhang W, Friedrich AW, Mellmann A, Tschäpe H, Karch H. Chromosomal dynamism in progeny of outbreak-related sorbitol-fermenting enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:NM. Appl Environ Microbiol 2006; 72: 1900-1909.
18. Blanco M, Blanco JE, González EA, Mora A, Jansen W, Gomes TAT, Zerbini F, Yano T, Pestana AF, Blanco J. Genes coding for enterotoxins and verotoxins in porcine *Escherichia coli* strains belonging to different O:K:H serotypes:relationship with toxic phenotypes. J Clin Microbiol 1997; 35: 2958-2963.
19. Blanco M, Padola NL, Krüger A, Sanz ME, Blanco JE, González EA, Dahbi G, Mora A, Bernárdez MI, Etcheverría AL, Arroyo GH, Lucchesi PMA, Parma AE, Blanco J. Virulence genes and intimin types of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle and beef products in Argentina. Int Microbiol 2004; 7: 269-276.

20. Boisen N, Struve C, Scheutz F, Krogfelt KA, Nataro JP. New adhesion of Enteroaggregative *Escherichia coli* related to the Afa/Dr/AAF family. *Infec Immun* 2008; 76: 3281-3292.
21. Bolton DJ, Duffy G, Baylis CL, Tozzoli R, Morabito S, Wasteson Y, Lofdahl S. Pathogenicity, virulence and emerging pathogenic *Escherichia coli*. *Pathogenic Escherichia coli Network* 2006
22. Bolton DJ. Verocytotoxigenic (Shiga toxin-producing) *Escherichia coli*: virulence factors and pathogenicity in the farm to fork paradigm. *Foodborne Pathog Dis* 2011; 8: 357-365.
23. Bonardi S, Bridani F, Pizzin G, Lucidi L, D'Incau M, Liebana E, Morabito S. Detection of *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica* and verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in pigs at slaughter in Italy. *Int J Food Microbiol* 2003; 85: 101-110.
24. Borges LG, Dalla Vecchia V, Corção G. Characterization and genetic diversity via REP-PCR of *Escherichia coli* isolates from polluted waters in southern Brazil. *FEMS Microbiol Ecol* 2003; 45: 173-180.
25. Borie C, Monreal Z, Guerrero P, Sánchez ML, Martínez J, Arellano C, Prado V. Prevalence and characterization of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* isolated from healthy cattle and pigs slaughtered in Santiago, Chile. *Arch Med Vet* 1997; 29: 205-12.
26. Botteldoorn N, Heyndrickx M, Rijpens N, Herman L. Detection and characterization of verotoxigenic *Escherichia coli* by a VTEC/EHEC multiplex PCR in porcine faeces and pig carcass swabs. *Res Microbiol* 2003; 154: 97-104.
27. Caprioli A, Nigrelli A, Gatti R, Zavanella M, Blando AM, Minelli F, Donelli G. Characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* isolated from pigs and cattle in northern Italy. *Vet Rec* 1993; 133: 323-324.
28. Caprioli A, Mobito S, Brugère H, Oswald E. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. *Vet Res* 2005; 36: 289-311.
29. Chapman PA, Siddons CA, Wright DJ. Cattle as a possible source of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 infections in man. *Epidemiol Infect* 1993; 111: 439-447.
30. Chapman TA, Wu XY, Barchia I, Bettelheim KA, Driesen S, Trott D, Wilson M, Chin JJ. Comparison of virulence gene profile of *Escherichia coli* strains isolated from healthy and diarrheic swine. *Appl Environ Microbiol* 2006; 72: 4782-4795.

31. Cheng D, Sun H, Xu J, Gao S. PCR detection of virulence factor genes in *Escherichia coli* isolates from weaned piglets with edema disease and/or diarrhea in China. *Vet Microbiol* 2006; 115: 320-328.
32. Chinen I, Tanaro JD, Miliwebsky E, Lound LH, Chillemi GM, Ledri S. Isolation and characterization of Shiga-producing *Escherichia coli* O157:H7 from retail meats in Argentina. *J Food Protect* 2001; 64: 1346-1351.
33. Choi C, Cho WS, Chung HK, Jung T, Kim J, Chae C. Prevalence of the enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxina 1 (EAST1) gene in isolates in weaned pigs with diarrhea and/or edema disease. *Vet Microbiol* 2001; 81: 65-71.
34. Clarke MB, Sperandio V. Events at the host-microbial interface of the gastrointestinal tract III. Cell-to-cell signaling among microbial flora, host and pathogens: there is a whole lot of talking going on. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 288: G1105-G1109.
35. Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66: 4555-4558.
36. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard- Third Edition. CLSI document M31-A3. 2008. Pennsylvania, USA.
37. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Nineteenth Edition. CLSI document M100-S19. 2009. Pennsylvania, USA.
38. Coombes BK, Gilmour MW, Goodman CD. The evolution of virulence in non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Frontiers Microbiol* 2011; 2: 1-3 [On line]
39. Cormick NA, Helgerson. Transmission and infectious dose of *Escherichia coli* O157:H7 in swine. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70: 5331-5335.
40. Cravioto, A, Gross RJ, Scotland SM, Rowe B. An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. *Curr Microbiol* 1979; 3: 95-99.
41. Croxen MA, Finlay BB. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nature Rev Microbiol* 2010; 8: 26-38.

42. Costa MM, Silva MS, Spricigo DA, Witt NM, Marchioro SB, Kolling L, Palmira A, de Vargas C. Caracterización epidemiológica, molecular e perfil de resistência aos antimicrobianos de *Escherichia coli* isoladas de criatórios suínos do sul do Brasil. *Pesq Vet Bras* 2006; 26: 5-8.
43. da Silveira WD, Ferreira A, Lancellotti M, Barbosa I, Leite DS, de Castro A, Brocchi M. Clonal relationships among avian *Escherichia coli* isolates determined by enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC)-PCR. *Vet Microbiol* 2002; 89: 323-328.
44. Dean-Nystrom E A, Bosworth B T, Cray W C, Jr & Moon H. Pathogenicity of *Escherichia coli* O157:H7 in the intestines of neonatal calves. *Infect Immun* 1997; 65: 1842-1848.
45. Dean-Nystrom EA, Melton-Celsa AR, Pohlenz JFL, Moon HW, O'Brien AD. Comparative pathogenicity of *Escherichia coli* O157 and intimin-negative non-O157 Shiga toxin-producing *E. coli* strains in neonatal pigs. *Infect Immun* 2003; 71: 6526-6533.
46. Dobrindt U. (Patho-) Genomics of *Escherichia coli*. *Int J Med Microbiol* 2005; 295: 357-371.
47. Sonnenberg MS, Whittam TS. Pathogenesis and evolution of virulence in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J Clin Invest* 2001; 107: 539-548.
48. Duan H, Chai T, Liu J, Zhang X, Qi C, Gao J, Wang Y, Cai Y, Miao Z, Yao M, Schlenker G. Source identification of airborne *Escherichia coli* of swine house surroundings using ERIC-PCR and REP-PCR. *Environ Res* 2009; 109: 511-517.
49. Dubreuil JD. *Escherichia coli* STb enterotoxin. *Microbiol* 1997; 143: 1783-1795.
50. Dubreuil JD. *Escherichia coli* STb toxin and colibacillosis: knowing is half the battle. *FEMS Microbiol Lett* 2008; 278: 137-145.
51. Dubreuil JD. STb and AIDA-I: The missing link? *Crit Rev Microbiol* 2010; 36: 212-220.
52. Fagan PK, Hornitzky MA, Bettelheim KA, Djordjevic SP. Detection of Shiga-like toxin (*stx*<sub>1</sub> and *stx*<sub>2</sub>), intimin (*eaeA*) and Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) hemolysin (EHEC *ehxA*) genes in animal feces by multiplex PCR. *App Environ Microbiol* 1999; 65: 868-872.
53. Fairbrother JM, Nadeau E, Gyles CL. *Escherichia coli* in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis and prevention strategies. *Anim Health Res Rev* 2005; 6: 17-39.
54. Fairbrother JM, Nadeau E. *Escherichia coli*: on-farm contamination of animals. *Rev Sci Ech Off Int Epiz* 2006; 25: 555-569.

55. Fekete PZ, Gerardin J, Jacquemin E, Mainil JG, Nagy B. Replicon typing of F18 fimbriae encoding plasmids of enterotoxigenic and verotoxigenic *Escherichia coli* strains from porcine postweaning diarrhea and oedema disease. *Vet Microbiol* 2002; 85: 275-284.
56. Ferens WA, Hoyde CJ. *Escherichia coli* O157:H7 animal reservoir and sources of human infection. *Foodborne Pathog Dis* 2011; 8: 465-487.
57. Fernández D, Rodríguez EM, Arroyo GH, Padola NL, Parma AE. Seasonal variation of Shiga toxin-encoding genes (stx) and detection of *E. coli* O157 in dairy cattle from Argentina. *J Appl Microbiol* 2009; 106: 1260-1267.
58. Fleckenstein JM, Hardwidge, Munson GP, Rasko DA, Sommerfelt, Steinsland H. Molecular mechanisms of enterotoxigenic *Escherichia coli* infection. *Microb Infect* 2010; 12: 89-98.
59. Fratamico PM, Bagi LK, Bush FJ, Solow BT. Prevalence and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in swine feces recovered in the National Animal Health Monitoring System's Swine 2000 study. *App Environ Microbiol* 2004; 70: 7173-7178.
60. Fratamico PM, Bhagwat AA, Injaian L, Fedorka-Cray PJ. Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from swine feces. *Foodborne Pathog Dis* 2008; 5: 827-837.
61. Friedrich AW, Zhang W, Bielaszewska M, Mellmann A, Köck R, Fruth A, Tschäpe H, Karch H. Prevalence, virulence profiles and clinical significance of Shiga toxin-negative variants of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 infection in humans. *Clin Infect Dis* 2007; 45: 39-45.
62. Frydendahl K. Prevalence of serogroups and virulence genes in *Escherichia coli* associated with postweaning diarrhea and edema disease in pigs and a comparison of diagnostic approaches. *Vet Microbiol* 2002; 85: 169-182.
63. Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual (FDA BAM). [On Line] [www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-24.html](http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-24.html).
64. Gannon VP, D'Souza S, Graham T, King RK, Rahn K, Read S. Use of the flagellar H7 gene as a target in multiplex PCR assay and improved specificity in identification of enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 656-652.

65. Galli L, Torres AG, Rivas M. Identification of the long polar fimbriae gene variants in the locus of enterocyte effacement-negative Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from humans and cattle in Argentina. *FEMS Microbiol Lett* 2010; 308: 123-129.
66. Gill A, Gill C. Non-O157 verotoxigenic *Escherichia coli* and beef: A Canadian perspective. *Can J Vet Res* 2010; 74: 161-169.
67. Gómez D, Miliwebsky E, Fernandez Pascua C, Baschkier A, Mamfredi E, Zotta M. Aislamiento y caracterización de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga en hamburguesas supercongeladas y quesos de pasta blanda. *Rev Arg Microbiol* 2002; 4: 66-71.
68. Goncalves C, Vachon V, Schwartz JL, Dubreuil JD. The *Escherichia coli* enterotoxin STb permeabilizes piglets jejuna brush border membrane vesicles. *Infect Immun* 2007; 75: 2208-2213.
69. Grimm LM, Goldoft M, Kobayashi J, Lewis JH, Alfi D, Perdichizzi AM, Tarr PI, Ongerth JE, Moseley SL, Samadpour M. Molecular Epidemiology of a Fast-Food Restaurant-Associated Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 in Washington State. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2155-2158.
70. Guinée PA, Jansen WH, Wadström T, Sellwood. *Escherichia coli* associated with neonatal diarrhea in piglets and calves. *Curr Top Vet Anim Sci* 1981; 13: 126-162.
71. Guth BE, Prado V, Rivas M. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. In *Pathogenic Escherichia coli in Latin America, 2010*, 65-83 Editor Alfredo Torres, University of Texas USA Bentham Sciences Publishers Ltd.
72. Gyles CL. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. *J Anim Sci* 2007; 85: E45-E62. [On line]
73. Ha SK, Choi C, Chae C. Prevalence of a gene encoding adhesin involved in diffuse adherence among *Escherichia coli* isolated in pigs with post-weaning diarrhea or edema disease. *J Vet Diag Invest* 2003; 15: 378-383.
74. Hahm BK, Maldonado Y, Schreiber E, Bhunia AK, Nakatsu CH. Subtyping of foodborne and environmental isolates of *Escherichia coli* by multiplex-PCR, rep-PCR, ribotyping and AFLP. *J Microbiol Methods* 2003; 53: 387-399.

75. Hammermueller J, Kruth S, Prescott J; Gyles J. Detection of toxin genes in *Escherichia coli* isolated from normal dogs and dogs with diarrhea. *Can J Vet Res* 1995; 59: 265-270.
76. Harel J, Lapointe H, Fallara A, Lortie LA, Bigras-Poulin M, Larivière, Fairbrother JM. Detection of genes for fimbrial antigens and enterotoxins associated with *Escherichia coli* serogroups isolated from pigs with diarrhea. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 745-752.
77. Harrington SM, Dudley EG, Nataro JP. Pathogenesis of enteroaggregative *Escherichia coli* infection. *FEMS Microbiol Lett* 2006; 254: 12-18.
78. Henderson IR, Nataro JP. Virulence functions of autotransporter proteins. *Infect Immun* 2001; 69: 1231-1243.
79. Herold S, Paton JC, Paton AW. Sab, a novel autotransporter of locus of enterocyte effacement negative shiga toxigénica *Escherichia coli* O113:h21 contributes to adherence and biofilm formation. *Infect Immun* 2009; 77: 3234-3243.
80. Hongyan A, Fairbrother JM, Désautels C, Mabrouk T, Dugourd D, Dezfulian H, Harel J. Presence of the LEE (locus of enterocyte effacement) in pig attaching and effacing *Escherichia coli* and characterization of *eae*, *espA*, *espB* and *espD* genes of PEPEC (pig EPEC) strain 1390. *Microb Pathog* 2000; 28: 291-300.
81. Horstman AL, Kuehn MJ. Enterotoxigenic *Escherichia coli* secretes active heat-labile enterotoxin via outer membrane vesicles. *J Biol Chem* 2000; 275: 12489-12496.
82. Hovde CJ, Austin PR, Cloud KA, Williams CJ, Hunt CW. Effect of cattle diet on *Escherichia coli* O157:H7 acid resistance. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65: 3233-3235.
83. Hulton CS, Higgins CF, Sharp PM. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. *Mol Microbiol* 1991; 5: 825-834.
84. Hunter PR, Gaston MA. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J Clin Microbiol* 1988; 26: 2465-2466.
85. Hussein HS. Prevalence and pathogenicity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef cattle and their products. *J Anim Sci* 2007; 85: E63-E72. [On line]
86. Jay MT, Cooley M, Carychao D, Wiscomb GW, Sweitzer RA, Crawford-Miksza L, Farrar JA, Lau DK, O'Connell J, Millington A, Asmundson RV, Atwill ER, Mandrell RE. *Escherichia coli*

- O157:H7 in fecal swine near spinach fields and cattle, Central California Coast. *Emerg Infect Dis* 2007; 13: 1908-1911.
87. Johnsen G, Wasteson Y, Heir E, Berget OI, Herikstad H. *Escherichia coli* O157:H7 in faeces from cattle, sheep and pigs in the southwest part of Norway during 1998 and 1999. *Int J Food Microbiol* 2001; 65: 193-200.
  88. Johnson TJ, Nolan LK. Pathogenomics of the virulence plasmids of *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev* 2009; 73: 750-774.
  89. Jordan DM, Booher SL, Moon HW. *Escherichia coli* O157:H7 does not require intimin to persist in pigs. *Infect Immun* 2005; 73: 1865-1867.
  90. Jure MA, Condorí S, Leotta GA, Chinen I, Miliwebsky E, Allori C, Aulet O, De Castillo MC. Detección, aislamiento y caracterización de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga a partir de carne molida fresca proveniente de carnicerías de Concepción, provincia de Tucumán. *Rev Arg Microbiol* 2010 42; 284-287.
  91. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 2004; 2: 123–140.
  92. Karch H, Bohm H, Schmidt H, Gunzer F, Aleksic S, Heesemann J. Clonal structure and pathogenicity of Shiga-like-producing, sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157:H-. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 1200-1205.
  93. Karch H, Tarr PI, Bielaszewska M. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in human medicine. *Int J Med Microbiol* 2005; 295: 405-418.
  94. Karmali MA, Gannon V, Sargeant JM. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC). *Vet Microbiol* 2010; 140: 360-370.
  95. Kaufmann M, Zweifel C, Blanco M, Blanco JE, Blanco J, Beutin L, Stephan R. *Escherichia coli* O157 and no-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in fecal samples of finished pigs at slaughter in Switzerland. *J Food Protec* 2006; 69: 260-266.
  96. Khac HV, Holoda E, Pilipcinec E, Blanco M, Blanco J, Mora A, Dahbi G, López C, González EA, Blanco J. Serotypes, virulence genes and PFGE profile of *Escherichia coli* isolated from pigs with postweaning diarrhoea in Slovakia. *Vet Res* 2006; 2: 10. [On line].

97. Kim JY, Kim SH, Know NH, Bae WK, Lim JY, Koo HC, Kim JM, Noh KM, Jung WK, Park KT, Park YH. Isolation and identification of *Escherichia coli* O157:H7 using different detection methods and molecular determination by multiplex PCR and RAPD. *J Vet Sci* 2005; 6: 7-19.
98. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. Enterobacteriaceae. En: *Diagnóstico Microbiológico*. 5ta Edición. Buenos Aires, Argentina, Ed Panamericana, 1999, p. 171-250.
99. Kuehn MJ, Kesty NC. Bacterial outer membrane vesicles and the host-pathogen interaction. *Genes Dev* 2005; 19: 2645-2655.
100. Kwon D, Choi C, Jung T, Chung HK, Kim JP, Bae SS. Genotypic prevalence of the fimbrial adhesions (F4, F5, F6, F41 and F18) and toxins (LT, STa, STb and Stx2e) in *Escherichia coli* isolated from postweaning pigs with diarrhea or oedema disease in Korea. *Vet Rec* 2002; 150: 35-37.
101. Labigne-Roussel AF, Lark D, Schoolnik G, Falkow S. Cloning and expression of an afimbrial adhesion (AFA-I) responsible for P blood group-independent, mannose-resistant hemagglutination from a pyelonephritic *Escherichia coli* strain. *Infect Immun* 1984; 46: 251-259.
102. Le Bouguéne C, Bertin Y. AFA and F17 adhesins produced by pathogenic *Escherichia coli* strains in domestic animals. *Vet Res* 1999; 30: 317-342.
103. Le Bouguéne C. Adhesins and invasions of pathogenic *Escherichia coli*. *Int J Med Microbiol* 2005; 295: 471-478.
104. Leclerc S, Boerlin P, Gyles C, Dubreuil JD, Mourez M, Fairbrother JM, Harel J. paa, originally identified in attaching and effacing *Escherichia coli*, is also associated with enterotoxigenic *E. coli*. *Res Microbiol* 2007; 158: 97-104.
105. Ledesma MA, Ochoa SA, Cruz A, Rocha LM, Mas J, Eslava CA, Girón JA, Xicohtencatl J. The hemorrhagic Coli Pilus (HCP) of *Escherichia coli* O157:H7 is an inducer of proinflammatory cytokine secretion in intestinal epithelial cells. *Plos One* 2010; 8: e12127. [On line].
106. Lee JH, Choi SJ. Isolation and characteristics of sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157 strains from cattle. *Microb Infect* 2006; 8: 2021-2026.

107. Lee SI, Kang SG, Kang ML, Yoo HS. Development of multiplex polymerase chain reaction assays for detecting enterotoxigenic *Escherichia coli* and their application to field isolates from piglets with diarrhea. *J Vet Diagn Invest* 2008; 20: 492-496.
108. Lefebvre B, Diarra MS, Fairbrother JM, Nadeau E, Dubois M, Malouin F. Intestinal mucosa adherence and cytotoxicity of a sorbitol-fermenting, Shiga-toxin-negative *Escherichia coli* O157:NM isolate with an atypical type III secretion system. *Foodborne Pathog Dis* 2010; 7: 985-990.
109. Leotta GA, Chinen I, Epszteyn S, Miliwebsky E, Melamed IC, Motter M, Ferrer M, Marey E, Rivas M. Validación de una técnica de PCR múltiple para la detección de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga. *Rev Arg Microbiol* 2005; 37: 1-10.
110. Leotta GA, Chinen I, Vigo GB, Gugliada J, Rivas M. Evaluación de dos técnicas de subtipificación molecular para el estudio de *Pasteurella multocida*. *Rev Arg Microbiol* 2006; 38: 190-196.
111. Leung KT, Mackereth R, Tien YC, Topp E. A comparison of AFLP and ERIC-PCR analyses for discriminating *Escherichia coli* from cattle, pig and human sources. *FEMS Microbiol Ecol* 2004; 47: 111-119.
112. Lienemann T, Salo E, Rimhanen-Finne R, Rönholm K, Taimisto M, Hirvonen JJ, Tarkka E, Kuusi M, Siitonen A. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotype O78:H<sup>-</sup> in family, Finland, 2009. *Emerg Infect Dis* 2012; 18: 577-581.
113. Lin JE, Valentino M, Marszalowicz G, Magee MS, Li P, Snook AE, Stoecker BA, Chang C, Waldman S. Bacterial heat-stable enterotoxin: translation of pathogenic peptides into novel targeted diagnostics and therapeutics. *Toxins* 2010; 2: 2028-2054.
114. Lindstedt BA, Vardund T, Kapperud G. Multiple-locus variable-number tandem-repeats analysis of *Escherichia coli* O157 using PCR multiplexing and multi-colored capillary electrophoresis. *J Microbiol Meth* 2004; 58:213-222.
115. Lindstedt BA. Multiple-locus variable number tandem repeats analysis for genetic fingerprinting of pathogenic bacteria. *Electrophoresis* 2005; 26: 2567-2582.

116. Lindstedt BA, Brandal LT, Aas L, Vardund T, Kapperud. Study of polymorphic variable-number of tandem repeats loci in the ECOR collection and in a set of pathogenic *Escherichia coli* and *Shigella* isolates for use in a genotyping assay. *J Microbiol Methods* 2007; 69: 197-205.
117. Lortie LA, Dubreuil JD, Harel J. Characterization of *Escherichia coli* strains producing heat-stable enterotoxina b (STb) isolated from humans with diarrhea. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 656-659.
118. Lu Z, Lapen D, Scott A, Dang A, Topp E. Identifying host sources of fecal pollution: diversity of *Escherichia coli* in confined dairy and swine production system. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71: 5992-5998.
119. Lucas KA, Pitari GM, Kazerounian S, Ruiz-Stewart I, Park J, Schulz S, Chepenik KP, Waldman SA. Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacol Rev* 2000; 52: 375-414.
120. Madoroba E, Van Driessche E, De Greve H, Mast J, Ncube I, Read J, Beeckmans S. Prevalence of enterotoxigenic *Escherichia coli* virulence genes from scouring piglets in Zimbabwe. *Trop Anim Health Prod* 2009; 41: 1539-1547.
121. Masana MO, Leotta GA, Del Castillo LL, D'Astek BA, Palladino PM, Galli L, Vilacoba E, Carbonari C, Rodriguez HP, Rivas M. Prevalence, characterization and genotypic analysis of *Escherichia coli* O157:H7/NM from selected beef exporting abattoirs of Argentina. *J Food Prot* 2010; 73: 649-656.
122. Masana MO, D'Astek BA, Palladino PM, Galli L, Del Castillo LL, Carbonari C, Leotta GA, Vilacoba E, Irino K, Rivas M. Genotypic characterization of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef abattoirs of Argentina. *J Food Prot* 2011; 74: 2008-2017
123. Mauro SA, Koudelka GB. Shiga toxin: expression, distribution, and its role in the environment. *Toxins* 2011; 3: 608-625.
124. Meacham KJ, Zhang L, Foxman B, Bauer RJ, Marrs CF. Evaluation of genotyping large numbers of *Escherichia coli* isolates by Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-PCR. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 5224-5226.
125. Mead PS, Griffin PM. *Escherichia coli* O157:H7. *Lancet* 1998; 352: 1207-1212.

126. Meichtri L, Miliwebsky E, Gioffré A, Chinen I, Baschkier A, Chillemi G, Guth BE, Masana MO, Cataldi A, Rodríguez HR, Rivas M. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in healthy young beef steers from Argentina: prevalence and virulence properties. *Int J Food Microbiol* 2004; 96: 189-198.
127. Miko A, Lindstedt BA, Brandal LT, Lobersli I, Beutin L. Evaluation of multiple-locus variable number of tandem-repeats analysis (MLVA) as a method for identification of clonal groups among enteropathogenic, enterohaemorrhagic and avirulent *Escherichia coli* O26 strains. *FEMS Microbiol Lett* 2010; 303: 137-146.
128. Moredo FA, Vigo GB, Sanz M, Aguirre JI, Armocida A, Perfumo CJ. Caracterización de cepas toxigénicas de *Escherichia coli* aisladas de cerdos con cuadros clínicos de diarrea pre y postdestete. *Analecta Vet* 1998; 18 (1/2): 29-34.
129. Moredo FA, Vigo GB, Cappuccio J, Piñeyro P, Perfumo CJ, Giacoboni GI. Resistencia a los antimicrobianos de aislamientos de *Escherichia coli* obtenidos de cerdos de la República Argentina. *Rev Arg Microbiol* 2007; 39: 227-229.
130. Moredo FA, Cappuccio JA, Pellegrino F, Insarralde L, Capalbo S, Quiroga MA, Perfumo CJ. Monitoreo de sensibilidad antimicrobiana de *Escherichia coli* aislados de lechones en la etapa postdestete. X° Congreso de la Asociación Latinoamericana de Veterinarios Especialistas en Cerdos, X° Congreso Nacional de Producción Porcina, 2010, Resumen S4, p. 248, Mendoza, Argentina.
131. Moredo FA, Cappuccio JA, Insarralde L, Perfumo CJ, Quiroga MA, Leotta GA. Caracterización genotípica de *Escherichia coli* aislados de cerdos con diarrea postdestete y enfermedad de los edemas. *Rev Arg Microbiol* 2012; 44: 85-88.
132. Mudrak B, Kuehn MJ. Heat-labile enterotoxin: beyond GM1 binding. *Toxins* 2010; 2: 1445-1470.
133. Murphy M, Minihan D, Buckley JF, O'Mahony M, Whyte P, Fanning S. Multiple-locus variable number of tandem repeats analysis (MLVA) of Irish verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157 from feedlot cattle: uncovering strain dissemination routes. *BMC Vet Res* 2008; 4: 2 [On line].
134. Nagy B, Fekete PZ. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in veterinary medicine. *Int J Med Microbiol* 2005; 295: 443-454.

135. Namvar A, Warriner K. Application of enterobacterial repetitive intergenic consensus-polymerase chain reaction to trace the fate of generic *Escherichia coli* within a high capacity pork slaughter line. *Internat J Food Microbiol* 2006; 108: 155-163.
136. Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11: 142-201.
137. Nataro JP, Steiner T, Guerrant RL. Enteroaggregative *Escherichia coli*. *Emerging Infect Dis* 1998; 4: 251-261.
138. Navarro-Garcia F, Sonnested M, Teter K. Host-toxin interactions involving EspC and Pet, two serine protease autotransporters of the Enterobacteriaceae. *Toxins (Basel)* 2010; 1: 1134-1147.
139. Naylor SW, Gally DL, Low JC. Enterohaemorrhagic *E. coli* in veterinary medicine. *Int J Med Microbiol* 2005; 295: 419-441.
140. Ngeleka M, Pritchard J, Appleyard G, Middleton DM, Fairbrother JM. Isolation and association of *Escherichia coli* AIDA-I/STb, rather than EAST1 pathotype, with diarrhea in piglets and antibiotic sensitivity of isolates. *J Vet Diag Invest* 2003; 15: 242-252.
141. Noamani BN, Fairbrother JM, Gyles CL. Virulence genes of O149 enterotoxigenic *Escherichia coli* from outbreaks of post-weaning diarrhea in pigs. *Vet Microbiol* 2003; 97: 87-101.
142. Notario R, Fain JC, Prado V, Ríos M, Borda N, Gambandé T. Prevalencia de *Escherichia coli* enterohemorrágico en una zona ganadera de Argentina. Caracterización genotípica de las cepas de origen animal. *Rev Méd Chile* 2000; 128: 1335-1341.
143. Ojeniyi B, Ahrens P, Meyling A. Detection of fimbrial and toxin genes in *Escherichia coli* and their prevalence in piglets with diarrhea. The application of colony hybridization assay, polymerase chain reaction and phenotypic assays. *J Vet Med B* 1994; 41: 49-59.
144. Ørskov I, Ørskov F. Serology of *Escherichia coli* fimbriae. *Prog Allergy* 1983; 33: 80-105.
145. Ørskov I, Sharmat V, Ørskov F. Influence of growth temperature on the development of *Escherichia coli* polysaccharide K antigens. *J Gen Microbiol* 1984; 30: 2681-2684
146. Ørskov F, Ørskov I, Villar JA. Cattle as reservoir of verotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. *Lancet* 1987; 1: 276.
147. Orth D, Grif K, Dierich MP, Würzner R. Sorbitol-fermenting Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157: indications for an animal reservoir. *Epidemiol Infect* 2006; 134: 719-723.

148. Osek J. Prevalence of virulence factors *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic and healthy piglets after weaning. *Vet Microbiol* 1999; 68: 209-217.
149. Osek J. Virulence factors and genetic relatedness of *Escherichia coli* strains isolated from pigs with post-weaning diarrhea. *Vet Microbiol* 2000a; 71: 211-222.
150. Osek J. Clonal analysis of *Escherichia coli* strains isolated from pigs with post-weaning diarrhea by pulsed-field gel electrophoresis. *FEMS Microbiol Lett* 2000b; 186: 327-331.
151. Osek J. Detection of the enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxina 1 (EAST1) gene and its relationship with fimbrial and enterotoxina markers in *E. coli* isolated from pigs with diarrhea. *Vet Microbiol* 2003a; 91: 65-72.
152. Osek J, Weiner M, Hartland EL. Prevalence of the IpfO113 gene cluster among *Escherichia coli* O157 isolates from different sources. *Vet Microbiol* 2003b; 96: 259-266.
153. O'Sullivan J, Bolton DJ, Duffy G, Baylis C, Tozzoli R, Wasteson Y, Lofdahl S. Methods for detection and molecular characterization of pathogenic *Escherichia coli*. Pathogenic *Escherichia coli* Network. Sixth Framework Programme (project number FOOD-CT-2006-036256).
154. Oteiza JM, Chinen I, Miliwebsky E, Rivas M. Isolation and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from precooked sausages (Morcillas). *Food Microbiol* 2006; 23: 283-288.
155. Padola NL, Sanz ME, Lucchesi PM, Blanco JE, Blanco M, Blanco J, Etcheverría AI, Arroyo GH, Parma AE. First isolation of the enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O145:H- from cattle in feedlot in Argentina. *BMC Microbiol* 2002; 2: 6-
156. Padola NL, Sanz ME, Blanco JE, Blanco M, Blanco J, Etcheverría AI, Arroyo GH, Usera MA, Parma A. Serotypes and virulence genes of Shiga toxigenic *Escherichia coli* (STEC) isolates from a feedlot in Argentina. *Vet Microbiol* 2004; 100: 3-9.
157. Paton AW, Srimanote P, Woodrow MC, Paton JC. Characterization of Saa, a novel autoagglutinating adhesion produced by locus of enterocyte effacement negative shiga-toxigenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans. *Infect Immun* 2001; 69: 6999-7009.

158. Paton AW, Paton JC. Multiplex PCR for direct detection of Shiga toxigénica *Escherichia coli* strains producing the novel subtilase cytotoxin. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 2944-2947.
159. Pantozzi FL, Moredo FA, Vigo GB, Giacoboni GI. Resistencia a los antimicrobianos en bacterias indicadoras y zoonóticas aisladas de animales domésticos en Argentina. *Rev Arg Microbiol* 2010; 42: 49-52.
160. Parma AE, Sanz ME, Blanco JE, Blanco J, Viñas MR, Blanco M, Padola NL, Etcheverría AL. Virulence genotypes and serotypes of verotoxigenic *Escherichia coli* isolated from cattle and foods in Argentina. Importance in public health. *Eur J Epidemiol* 2000a; 16: 757-762.
161. Parma AE, Sanz ME, Viñas MR, Cicuta ME, Blanco JE, Boehringer SI, et al. Toxigenic *Escherichia coli* isolated from pigs in Argentina. *Vet Microbiol* 2000b; 72: 269-276.
162. Pitchel MG, Binsztein N, Qadri F, Giron JA, Type IV longus pilus of enterotoxigenic *Escherichia coli*: occurrence and association with toxins types and colonization factors among strains isolated in Argentina. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 694-697.
163. Ravi M, Ngeleka M, Kim S, Gyles C, Berhiau F, Mourez M, Middleton D, Simko E. Contribution of AIDA-I to the pathogenicity of a porcine diarrheagenic *Escherichia coli* and to intestinal colonization through biofilm formation in pigs. *Vet Microbiol* 2007; 120: 308-319.
164. Rendón MJ, Saldaña Z, Erdem AL, Monteiro-Neto V, Vázquez A, Kaper JB, Puente JL, Girón JA. Commensal and pathogenic *Escherichia coli* use a common pilus adherence factor for epithelial cell colonization. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 10637-10642.
165. Riley LW, Remis RS, Helgerson SD, McGee HB, Wells JG, Davis BR, Hebert RJ, Olcott ES, Johnson LM, Hargrett NT, Blake PA, Cohen ML. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotypes. *N Engl J Med* 1983; 308: 681-685.
166. Ríos M, Prado V, Trucksis M, Arellano C, Borie C, Alexandre M, Fica A, Levine MM. Clonal diversity of Chilean isolates of enterohemorrhagic *Escherichia coli* from patients with hemolytic-uremic syndrome, asymptomatic subjects, animal reservoirs, and food products. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 778-781.
167. Rivas M, Miliwebsky E, Chinen I, Roldán CD, Balbi L, Garcia B, Fiorilli G, Sosa Estani S. Characterization and epidemiologic subtyping of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains

- isolated from hemolytic uremic síndrome and diarrhea cases in Argentina. *Foodborne Pathog Dis* 2006; 3: 88-96.
168. Rosengren LB, Waldner CL, Reid-Smith RJ, Checkley SL, McFall ME, Rajic A. Antimicrobial resistance of fecal *Escherichia coli* isolated from grow-finish pigs in 20 herds in Alberta and Saskatchewan. *Can J Vet Res* 2008; 72: 160-167.
169. Rosengren LB, Waldner CL, Reid-Smith RJ. Associations between antimicrobial resistance phenotypes, antimicrobial genes and virulence genes of fecal *Escherichia coli* isolates from healthy grow-finish pigs. *Appl Environ Microbiol* 2009; 75: 1373-1380.
170. Rousset E, Harel J, Dubreuil JD. Sulfatide from the pig jejunum brush border epithelial cell surface is involved in binding of *Escherichia coli* enterotoxin b. *Infect Immun* 1998; 66: 5650-5658.
171. Ruiz N. Bioinformatics identification of MurJ (MviN) as the peptidoglycan lipid II flipase in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 15553-15557.
172. Rüttler ME, Yanzón CS, Cuitiño MJ, Renna NF, Pizarro MA y Ortiz AM. Evaluation of a multiplex PCR method to detect enteroaggregative *Escherichia coli*. *Biocell* 2006; 30: 301-308.
173. Sanz ME, Viñas RM, Parma AE. Prevalence of bovine verotoxin-producing *Escherichia coli* in Argentina. *Eur J Epidemiol* 1998; 14: 399-403.
174. Sauer FG, Barnhart M, Choudhury D, Knight SD, Waksman G, Hultgren SJ. Chaperone-assisted pilus assembly and bacterial attachment. *Curr Opin Struct Biol* 2000; 10: 548-556.
175. Scheutz F, Strockbine NA. Genus I. *Escherichia*. In: Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, editors. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2<sup>ed</sup>. 2005. Springer. USA p 607-624.
176. Schierack P, Steinrück, Kleita S, Vahjen W. Virulence factor gene profiles of *Escherichia coli* isolates from clinically healthy pigs. *Appl Environ Microbiol* 2006; 72: 6680-6686.
177. Schierack P, Weinreich J, Ewers C, Tachu B, Nicholson B, Barth S. Hemolytic porcine intestinal *Escherichia coli* without virulence-associated genes typical of intestinal pathogenic *E. coli*. *Appl Environ Microbiol* 2011; 77: 8451-8455.
178. Schimmer B, Nygard K, Eriksen HM, Lassen J, Lindstedt BA, Brandal LT, Kapperud G, Aavitsland P. Outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Norway caused by stx2-positive

- Escherichia coli* O103:H25 traced to cured mutton sausages. BMC Infect Dis 2008; 8: 41 [Online].
179. Schmidt H, Beutin L, Karch H. Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933. Infect Immun 1995; 63: 1055-1061.
180. Sheng H, Wang J, Lim JY, Davitt C, Minnich SA, Hovde CJ. Internalization of *Escherichia coli* O157:H7 by bovine rectal epithelial cells. Front Microbiol 2011; 2: 1-10.
181. Sherlock O, Schembri MA, Reisner A, Klemm P. Novel roles for the AIDA adhesins from diarrheagenic *Escherichia coli*: cell aggregation and biofilm formation. J Bacteriol 2004; 186: 8058-8065.
182. Silva de Paula CJ, Marin JM. Occurrence of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in dogs with diarrhea. Ciência Rural, Santa María, 2008; 38: 1682-1686.
183. Silva Duque S, Silva RM, Sabra A, Carvalho Campos L. Primary fecal cultura used as template for PCR detection of diarrheagenic *Escherichia coli* virulence factors. J Microbiol Methods 2002; 51: 241-246.
184. Sinclair JF, O'Brien AD. Cell surface-localized nucleolin is a eukaryotic receptor for the adhesin intimin-gamma of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. J Biol Chem 2002; 277: 2876-2885.
185. Sonntag AK, Bielaszewska M, Mellmann A, Dierksen N, Schierack P, Wieler LH, Schmidt A, Karch H. Shiga toxin 2e-producing *Escherichia coli* isolates from humans and pigs differ in their virulence profiles and interactions with intestinal epithelial cells. Appl Environ Microbiol 2005; 71: 8855-8863.
186. Spratt, B. G. Multilocus sequence typing: molecular typing of bacterial pathogens in an era of rapid DNA sequencing and the internet. Curr Opin Microbiol 1999; 2: 312-316.
187. Stephan R, Zhang W, Bielaszewska M, Mellmann A, Karch H. Phenotypic and genotypic traits of Shiga toxin-negative *E. coli* O157:H7/H- bovine and porcine strains. Foodborne Pathog Dis 2009; 6: 235-243.
188. Sugimoto N, Shima K, Hinenoya A, Asakura M, Matsuhisa A, Watanabe H, Yamasaki S. Evaluation of a PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) assay for

- molecular epidemiological study of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. J Vet Med Sci 2011; 73: 859-867.
189. Taillon C, Nadeau E, Mourez M, Dubreuil JD. Heterogeneity of *Escherichia coli* STb enterotoxin isolated from diseased pigs. J Med Microbiol 2008; 57: 887-890.
190. Tanaro JD, Leotta GA, Lound LH, Galli L, Piaggio MC, Carbonari CC, Araujo S, Rivas M. *Escherichia coli* O157 in bovine feces and surface water streams in a beef cattle farm of Argentina. Foodborne Pathog Dis 2010; 7: 475-477.
191. Tauschek M, Gorrell RJ, Srugnell RA; Robins-Browne RM. Identification of a protein secretory pathway for the secretion of heat-labile enterotoxin by an enterotoxigenic strain of *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci USA 2002; 99: 7066-7071.
192. Toma C, Lu Y, Higa N, Nakasone N, Chinen I, Baschkier A, Rivas M, Iwanaga M. Multiplex PCR assay for identification of human diarrheagenic *Escherichia coli*. J Clin Microbiol 2003; 41: 2669-2671.
193. Torres AG, Blanco M, Valenzuela P, Slater TM, Patel SD, Dahbi G, López C, Fernández Barriga X, Blanco J, Gomes T, Vidal R, Blanco J. Genes related to long polar fimbriae of pathogenic *Escherichia coli* strains as reliable markers to identify virulent isolates. J Clin Microbiol 2009; 47: 2442-2451.
194. Trabulsi LR, Keller R, Tardelli Gomes TA. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. Emerg Infect Dis 2002; 8: 508-513.
195. United States Department of Agriculture (USDA). Laboratory Guidebook Notice of Change. MLG 5.05. Detection, Isolation and Identification of *Escherichia coli* O157:H7 from Meat Products. 2010. Laboratory QA/QC, Athens, GA
196. Van de Peer, Y, De Wachter R. TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. Comput Applic Biosci 1994; 10: 569-570.
197. Van den Broeck W, Cox E, Oudega B, Goddeeris BM. The F4 fimbrial antigen of *Escherichia coli* and its receptors. Vet Microbiol 2000; 71: 223-244.
198. Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR, Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. Nucleic Acids Res 1991; 19 :6823-6831.

199. Vidal R, Vidal M, Lagos R, Levine M, Prado V. Multiplex PCR for diagnosis of enteric infections associated with diarrheagenic *Escherichia coli*. J Clin Microbiol 2004; 42: 1787-1789.
200. Vidal JE, Canizález Román A, Gutiérrez Jiménez J, Navarro García F. Patogénesis molecular, epidemiología y diagnóstico de *Escherichia coli* enteropatógena. Salud Pública de México 2007; 49: 376-386.
201. Von Muffling T, Smajilovic M, Nowak B, Sammet K, Bülte M, Klein G. Preliminary study of certain serotypes, genetic and antimicrobial resistance profiles of verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) isolated in Bosnia and Germany from cattle or pigs and their products. Int J Food Microbiol 2007; 117: 185-191.
202. Weiglmeier PR, Rösch P, Berkner H. Cure and curse: *E. coli* heat-stable enterotoxin and its receptor guanylyl cyclase C. Toxins 2010; 2: 2213-2229.
203. Weintraub A. Enteroaggregative *Escherichia coli*: epidemiology, virulence and detection. J Med Microbiol 2007; 56: 4-8.
204. Wells JG, Shipman LD, Greene KD, Sowers EG, Green JH, Cameron DN, Downes FP, Martin ML, Griffin PM, Ostroff SM. Isolation of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and other Shiga-like-toxin-producing *E. coli* from dairy cattle. J Clin Microbiol 1991; 29: 985-989.
205. Westerlund-Wikström B, Korhonen T. Molecular structure of adhesin domains in *Escherichia coli* fimbriae. Int J Med Microbiol 2005; 295: 479-486.
206. Whipp SC, Moon HW, Kemeny LJ, Argenzio RA. Effect of virus-induced destruction of villous epithelium on intestinal secretion induced by heat-stable *Escherichia coli* enterotoxins and prostaglandin E1 in swine. Am J Vet Res 1985; 46: 637-642.
207. Wiczorek K, Kowalczyk A, Osek J. Relationships between phenotype and genotype of *Escherichia coli* O149:K91, F4 strains isolated from pigs with diarrhea. Bull Vet Inst Pulawy 2004; 48: 219-223.
208. Williams AP, McGregor KA, Killham K, Jones DL. Persistence and metabolic activity of *Escherichia coli* O157:H7 in farm animal faeces. FEMS Microbiol Lett 2008; 287: 168-173.

209. Woodward MJ, Carroll PJ, Wray C. Detection of entero- and verocytotoxin genes in *Escherichia coli* from diarrhoeal disease in animals using the polymerase chain reaction. *Vet Microbiol* 1992; 31: 251-261.
210. Wu XY, Chapman T, Trott DJ, Bettelheim K, Do TN, Driesen S, Walker MJ, Chin J. Comparative analysis of virulence genes, genetic diversity and phylogeny of commensal and enterotoxigenic *Escherichia coli* isolates from weaned pigs. *Appl Environ Microbiol* 2007; 73: 83-91.
211. Yamamoto T, Nakazawa M. Detection and sequences of the enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 gene in enterotoxigenic *E. coli* strains isolated from piglets and calves with diarrhea. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 223-227.
212. Young KD. The selective value of bacterial shape. *Microbiol Mol Biol Rev* 2006; 70: 660-703.
213. Yuan W, Chai TJ, Miao ZM. ERIC-PCR identification of the spread of airborne *Escherichia coli* in pig houses. *Sci Total Environ* 2010; 408: 1446-1450.
214. Zajacova ZS, Konstantinova L, Alexa P. Detection of virulence factors of *Escherichia coli* focused on prevalence of EAST1 toxin in stool of diarrheic and non-diarrheic piglets and presence of adhesion involving virulence factors in *astA* positive strains. *Vet Microbiol* 2012; 154: 369-375.
215. Zhang W, Zhao M, Ruesch L, Omot A, Francis D. Prevalence of virulence genes in *Escherichia coli* strains recently isolated from young pigs with diarrhea in the US. *Vet Microbiol* 2007; 123: 145-152.
216. Ziebell K, Konczyk P, Yong I, Frost S, Mascarenhas M, Kropinski AM, Whittam TS, Read SC, Karmali MA. Applicability of phylogenetic methods for characterizing the public health significance of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* strains. *Appl Environ Microbiol* 2008; 74: 1671-1675.
217. Zweifel C, Schumacher S, Beutin L, Blanco J, Stephan R. Virulence profile of Shiga toxin 2e-producing *Escherichia coli* isolated from healthy pig at slaughter. *Vet Microbiol* 2006; 117: 328-332.

## ANEXO

**Tabla 29. Reacciones fisiológicas y bioquímicas consideradas para la caracterización fenotípica de *Escherichia coli***

Reacción	<i>Escherichia coli</i>
Producción de indol	98
Citrato (Simmons)	1
Hidrógeno sulfurado (TSI)	1
Lisina decarboxilasa	90
Ornitina decarboxilasa	65
Movilidad	95
D-glucosa, acidificación	100
D-glucosa, producción de gas	95
Lactosa, fermentación	95
D-manitol, fermentación	98
Celobiosa, fermentación	2
Producción de pigmento amarillo	0
Producción de $\beta$ -glucuronidasa	

Los valores corresponden al porcentaje de reacciones positivas luego de 2 días de incubación a 36° C.

**Tabla 30. Puntos de corte utilizados para Enterobacterias según CLSI**

Antimicrobiano	Sensible	Sensibilidad Intermedia	Resistente	
Ampicilina <sup>1</sup>	≥ 17	14-16	≤ 13	
Amoxicilina/ácido clavulánico <sup>1</sup>	≥ 18	14-17	≤ 13	
Cefalotina <sup>1</sup>	≥ 18	15-17	≤ 14	
Cefotaxima*	≥ 23	15-22	≤ 14	
Cefoxitina*	≥ 18	15-17	≤ 14	
Gentamicina <sup>1</sup>	≥ 15	13-14	≤ 12	
Amicacina <sup>1</sup>	≥ 17	15-16	≤ 14	
Estreptomicina*	≥ 15	12-14	≤ 11	
Tetraciclina <sup>2</sup>	≥ 19	15-18	≤ 14	
Ácido nalidíxico*	≥ 19	14-18	≤ 13	
Ciprofloxacina*	≥ 21	16-20	≤ 15	
Trimetoprima/Sulfametoxazol <sup>1</sup>	≥ 16	11-15	≤ 10	
Cloranfenicol <sup>1</sup>	≥ 18	13-17	≤ 12	
Florfenicol <sup>2</sup>	≥ 22	19-21	≤ 18	Puntos de corte para enfermedades respiratorias de los cerdos
Fosfomicina*	≥ 16	13-15	≤ 12	
Nitrofurantoína*	≥ 17	15-16	≤ 14	
Colistina*	≥ 11	-	≤ 10	Puntos de corte para <i>Pseudomonas aeruginosa</i>

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute. \*Puntos de corte que sólo se encuentran en la guía M100-S19 Tabla 2A M02-M07. 1 Los puntos de corte son iguales en ambas guías. 2 Los puntos de corte son los pertenecientes a la guía M31-A3.

**PCR múltiple utilizada para la detección de cerdos portadores y posterior aislamiento de ETEC mediante la demostración de los genes *elt* y *estI* que codifican la producción de las toxinas LT y STa**

Genes de virulencia	Primer	Secuencia DNA (5´- 3´)	Producto amplificado (bp)
<i>elt</i>	LT <sub>F</sub>	TCTCTATGTGCATACGGAGC	322
	LT <sub>R</sub>	CCATACTGATTGCCGCAAT	
<i>estI</i>	AL65	TTAATAGCACCCGGTACAAGCAGG	147
	AL125	CCTGACTCTTCAAAAGAGAAAATTAC	

**Mezcla PCR**

Volumen final: 50 µl

10x PCR buffer: 5 µl (Invitrogen)

dNTPs: 0,2 µM de cada uno

MgCl<sub>2</sub>: 1,5 µM

Cebadores: LT<sub>F</sub> y LT<sub>R</sub> 0,25 µM de cada uno

AL65 y AL125 0,5 µM de cada uno

Taq polimerasa (Invitrogen): 1,25 U

ADN molde: 2 µl

**Condiciones de PCR para la amplificación**

Desnaturalización Inicial: 3 min a 95° C

Desnaturalización: 1 min a 95° C

Pegado de cebadores: 1 min a 52° C

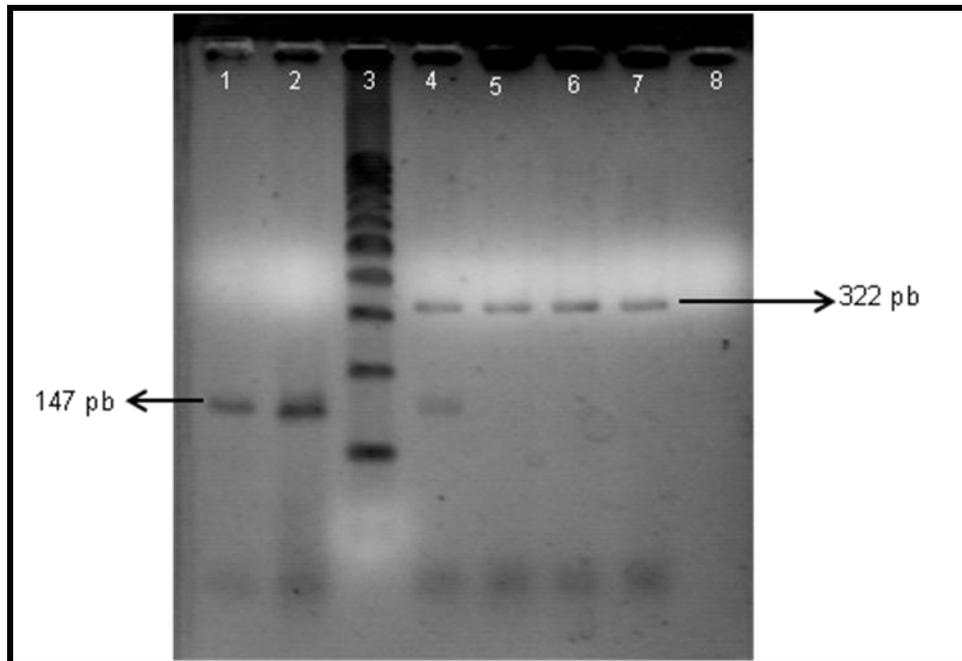
Extensión: 1 min a 72° C

Extensión final: 10 min a 72° C

} 30 ciclos

**Control positivo**: *Escherichia coli* ATCC 33965

### Gel de Agarosa al 2 %



**Productos amplificados por PCR para la detección de los genes *eltA* y *estI* en *Escherichia coli* de origen porcino.** Líneas 1 y 2: *E. coli/estI* aislados de cerdos clínicamente sanos. Línea 3: marcador de tamaño molecular Cien Marker. Línea 4: control positivo *E. coli* ATCC 33965 *eltA/estI*. Líneas 5, 6 y 7: *E. coli/eltA* aislados de cerdos clínicamente sanos. Línea 8: control de reactivo (mezcla sin ADN molde).

**Referencia:** Toma C, Lu Y, Higa N, Nakasone N, Chinen I, Baschkier A, Rivas M, Iwanaga M. Multiplex PCR assay for identification of human diarrheagenic *Escherichia coli*. J Clin Microbiol 2003; 41: 2669-2671.

**PCR múltiple utilizada para la detección de cerdos portadores y posterior aislamiento de STEC y *Escherichia coli* O157 no toxigénicos mediante la demostración de los genes *stx*<sub>1</sub>, *stx*<sub>2</sub> y *rfb*<sub>O157</sub>**

Genes de virulencia	Primer	Secuencia DNA (5' - 3')	Producto amplificado (bp)
<i>stx</i> <sub>1</sub>	Stx1a	GAAGAGTCCGTGGGATTACG	130
	Stx1b	AGCGATGCAGCTATTAATAA	
<i>stx</i> <sub>2</sub>	Stx2a	TTCACCACACCCCACCGGGCAGT	346
	Stx2b	GCTCTGGATGCATCTCTGGT	
<i>rfb</i> <sub>O157</sub>	O157F	CGGACATCCATGTGATATGG	259
	O157R	TTGCCTATGTACAGCTAATCC	

**Mezcla PCR**

Volumen final: 50 µl

10x PCR buffer: 5 µl (Invitrogen)

dNTPs: 0,1 mM de cada uno

MgCl<sub>2</sub>: 1,5 µM

Cebadores: Stx1a y Stx1b 2 pmol/µl de cada uno

Stx2a, Stx2b, O157F y O157R 0,4 pmol/µl de c/u

Taq polimerasa (Invitrogen): 1U

ADN molde: 2 µl

**Condiciones para la amplificación**

Desnaturalización Inicial: 5 min a 94° C

Desnaturalización: 30 seg a 94° C

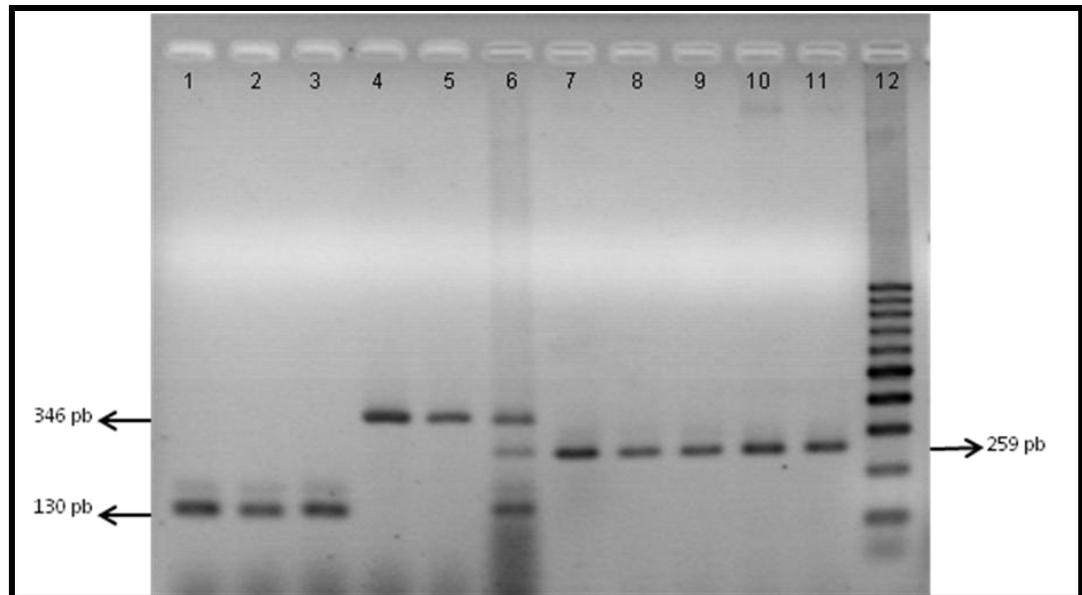
Pegado de cebadores: 30 seg a 58° C

Extensión: 30 seg a 72° C

Extensión final: 2 min a 72° C

} 30 ciclos

**Control positivo**: *Escherichia coli* ED933

**Gel de Agarosa al 2 %**

**Productos amplificados por PCR para la detección de los genes *stx*<sub>1</sub>, *stx*<sub>2</sub> y *rfb*<sub>O157</sub> en *Escherichia coli* de origen porcino.** Líneas 1, 2 y 3: *E. coli/stx*<sub>1</sub> aislados de cerdos clínicamente sanos. Líneas 4 y 5: *E. coli/stx*<sub>2</sub><sup>+</sup> aislados de cerdos clínicamente sanos. Línea 6: control positivo *E. coli* EDL933 *stx*<sub>1</sub>/*stx*<sub>2</sub>/*rfb*<sub>O157</sub>. Líneas 7, 8, 9, 10 y 11: *E. coli rfb*<sub>O157</sub> aislados de cerdos clínicamente sanos. Línea 12: marcador de tamaño molecular Cien Marker.

**Referencia:** Leotta GA, Chinen I, Epszteyn S, Miliwebsky E, Melamed IC, Motter M, Ferrer M, Marey E, Rivas M. Validación de una técnica de PCR múltiple para la detección de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga. Rev Arg Microbiol 2005; 37: 1-10.

**PCR utilizada para la detección de cerdos portadores y aislamiento de *Escherichia coli* portadores del gen *stx*<sub>2e</sub>**

Gen de virulencia	Primer	Secuencia DNA (5´- 3´)	Producto amplificado (bp)
<i>stx</i> <sub>2e</sub>	Stx2eA	CCTTAACTAAAAGGAATATA	230
	Stx2eB	CTGGTGGTGTATGATTAATA	

**Mezcla PCR**

Volumen final: 50 µl

10x PCR buffer: 5 µl (Invitrogen)

dNTPs: 0,2 µM de cada uno

MgCl<sub>2</sub>: 1,5 µM

Cebadores: 450 ng (de cada uno)

Taq polimerasa (Invitrogen): 1U

ADN molde: 2 µl

**Condiciones de PCR para la amplificación**

Desnaturalización Inicial: 3 min a 94° C

Desnaturalización: 1 min a 94° C

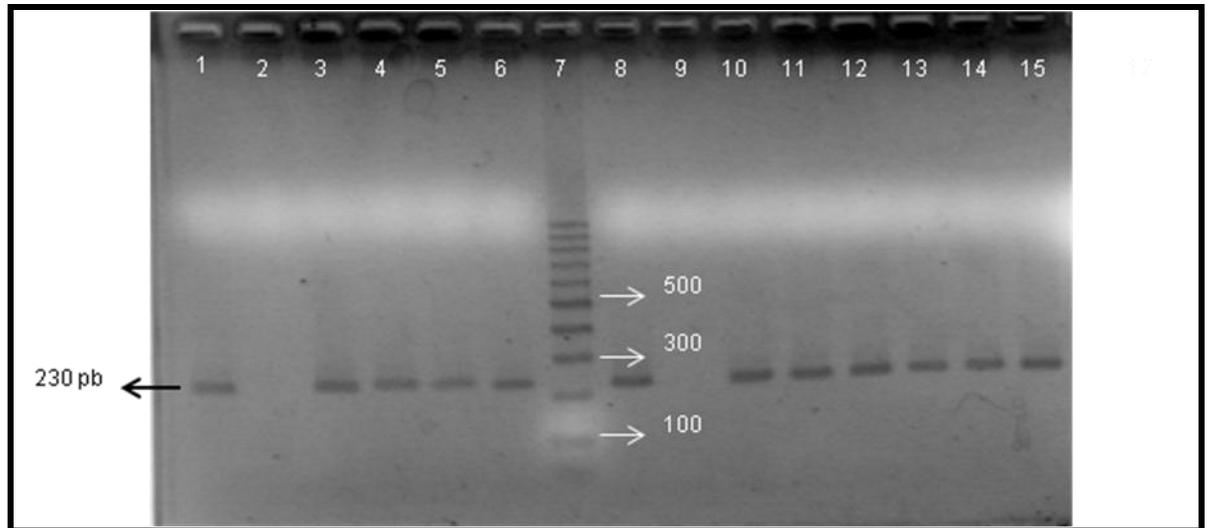
Pegado de cebadores: 1 min a 55° C

Extensión: 1 min a 72° C

Extensión final: 5 min a 72° C

} 30 ciclos

**Control positivo:** *Escherichia coli* LS-77-6 I

**Gel de Agarosa al 2 %**

**Productos amplificados por PCR para la detección del gen  $stx_{2e}$  en *Escherichia coli* de origen porcino.** Línea 1: control positivo *E. coli* LS 77-6 I  $stx_{2e}^+$ . Línea 2: control de reactivo (mezcla sin ADN molde). Líneas 3, 4, 5, 6, 8, 10, 11, 12, 13, 14 y 15: STEC/  $stx_{2e}^+$  aislados de cerdos clínicamente sanos. Línea 9: *E. coli*/ $stx_{2e}^+$  aislado de un cerdo clínicamente sano. Línea 7: marcador de tamaño molecular Cien Marker.

**Referencia:** Blanco M, Blanco J, Gonzalez E, Mora A, Jansen W, Gomes T, Zerbini F, Yano T, Pestana de Castro AF, Blanco J. Genes coding for enterotoxins and verotoxins in porcine *Escherichia coli* strains belonging to different O:K:H serotypes: relationship with toxic phenotypes. J Clin Microbiol 1997; 35: 2958-2963.

**PCR utilizada para la caracterización genotípica de STEC, ETEC y *Escherichia coli* O157 no toxigénicos determinando la presencia del gen *eae***

Gen de virulencia	Primer	Secuencia DNA (5´- 3´)	Producto amplificado (bp)
<i>eae</i>	SK1	CCCGAATTCGGCACAAGCATAAGC	864
	SK2	CCGGATCCGTCTCGCCAGTATTCG	

**Mezcla PCR**

Volumen final: 50 µl

10x PCR buffer: 5 µl (Invitrogen)

dNTPs: 0,1 mM de cada uno

MgCl<sub>2</sub>: 1 mM

Cebadores: 0,4 pmol/µl (de cada uno)

Taq polimerasa (Invitrogen): 1U

ADN molde: 2 µl

**Condiciones de PCR para la amplificación**

Desnaturalización Inicial: 5 min a 94° C

Desnaturalización: 30 seg a 94° C

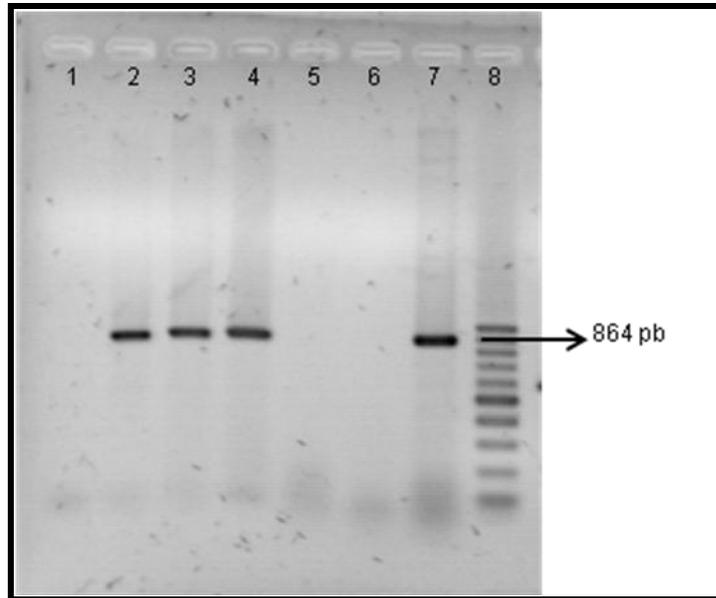
Pegado de cebadores: 1 min a 54° C

Extensión: 2 min a 72° C

Extensión final: 2 min a 72° C

} 30 ciclos

**Control positivo:** *Escherichia coli* ED933

**Gel de Agarosa al 1 %**

**Productos amplificados por PCR para la detección del gen eae en *E. coli* O157 no toxigénicos de origen porcino.** Línea 1: control de reactivo (mezcla sin ADN molde). Líneas 2, 3 y 4: *E. coli* O157 no toxigénicos *eae*<sup>+</sup> aislados de cerdos clínicamente sanos. Líneas 5 y 6: *E. coli* no toxigénicos *eae*<sup>-</sup> aislados de cerdos clínicamente sanos. Línea 7: control positivo ED933 *eae*<sup>+</sup>. Línea 8: marcador de tamaño molecular Cien Marker.

**Referencia:** Karch H, Bohm H, Schmidt H, Gunzer F, Aleksic S, Heesemann J. Clonal structure and pathogenicity of Shiga-like-producing, sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157:H<sup>-</sup>. J Clin Microbiol 1993; 31: 1200-1205.

**PCR utilizada para la caracterización genotípica de STEC y *Escherichia coli* O157 no toxigénicos determinando la presencia del gen *ehxA***

Gen de virulencia	Primer	Secuencia DNA (5' - 3')	Producto amplificado (bp)
<i>ehxA</i>	ehxA1	GGTGCAGCAGAAAAAGTTGTAG	1551
	ehxA4	TCTCGCCTGATAGTGTGGTA	

**Mezcla PCR**

Volumen final: 50 µl

10x PCR buffer: 5 µl (Invitrogen)

dNTPs: 0,1 mM de cada uno

MgCl<sub>2</sub>: 1,5 mM

Cebadores: 0,4 pmol/µl (de cada uno)

Taq polimerasa (Invitrogen): 2U

ADN molde: 2 µl

**Condiciones de PCR para la amplificación**

Desnaturalización Inicial: 5 min a 94° C

Desnaturalización: 30 seg a 94° C

Pegado de cebadores: 90 seg a 58° C

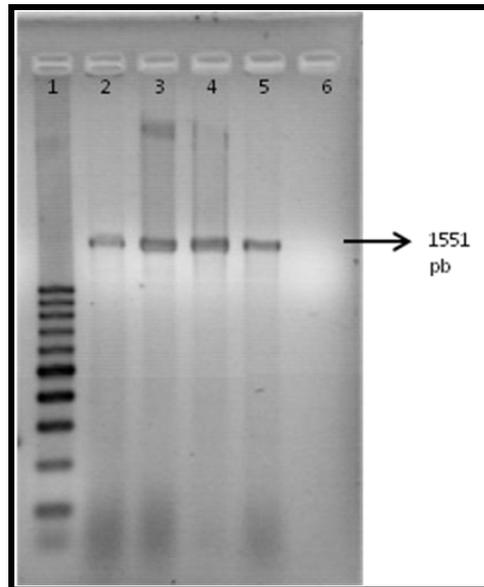
Extensión: 90 seg a 72° C

Extensión final: 3 min a 72° C

} 30 ciclos

**Control positivo:** *Escherichia coli* E32511

### Gel de Agarosa al 0,8 %



**Productos amplificados por PCR para la detección del gen *ehxA* en STEC de origen porcino.** Línea 1: marcador de tamaño molecular Cien Marker. Líneas 2, 3 y 4: STEC *ehxA*<sup>+</sup> aislados de cerdos clínicamente sanos. Línea 5: control positivo *E. coli* E32511 EHEC- *ehxA*<sup>+</sup>. Línea 6: control de reactivo (mezcla sin ADN molde).

**Referencia:** Schmidt H, Beutin L, Karch H. Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933. Infect Immun 1995; 63: 1055-1061.

**PCR utilizada para la caracterización genotípica de EPEC y *Escherichia coli* O157 no toxigénicos determinando la presencia del gen *fliC<sub>H7</sub>***

Gen de virulencia	Primer	Secuencia DNA (5´- 3´)	Producto amplificado (bp)
<i>fliCh7</i>	FLICH7-F	GCGCTGTCGAGTTCTATCGAGC	625
	FLICH7-R	CAACGGTGACTTTATCGCCATTCC	

**Mezcla PCR**

Volumen final: 50 µl

10x PCR buffer: 5 µl (Invitrogen)

dNTPs: 0,15 mM de cada uno

MgCl<sub>2</sub>: 1,5 mM

Cebadores: 0,6 pmol/µl (de cada uno)

Taq polimerasa (Invitrogen): 1U

ADN molde: 2 µl

**Condiciones de PCR para la amplificación**

Desnaturalización Inicial: 1min a 94° C

Desnaturalización: 15 seg a 94° C

Pegado de cebadores: 15 seg a 60° C

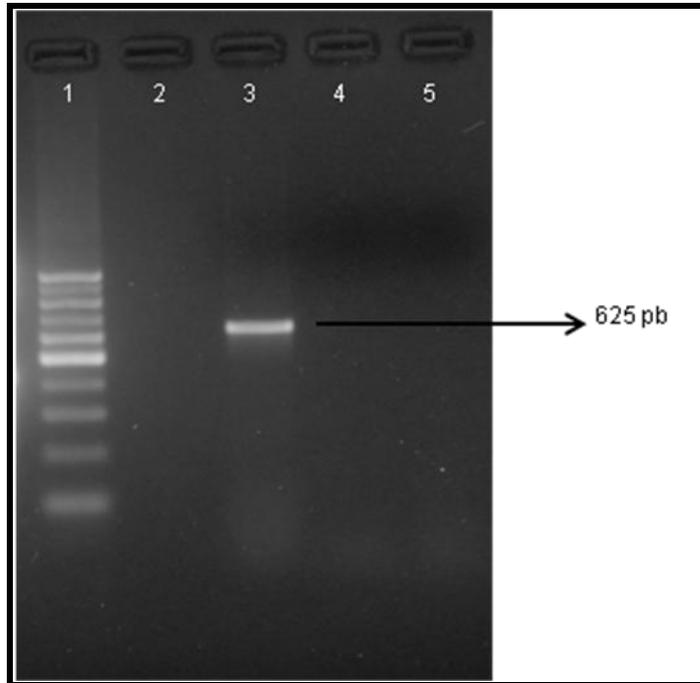
Extensión: 75 seg a 72° C

Extensión final: 5 min a 72° C

} 35 ciclos

**Control positivo:** *Escherichia coli* ED933

### Gel de Agarosa al 2 %



**Productos amplificados por PCR para la detección del gen *fliCH7* en *E. coli* O157 no toxigénicos de origen porcino.** Línea 1: marcador de tamaño molecular Cien Marker. Líneas 2: control de reactivo (mezcla sin ADN molde). Línea 3: control positivo *E. coli* ED933. Líneas 4 y 5: *E. coli* O157 no toxigénicos *fliCH7*.

**Referencia:** Gannon VP, D'Souza S, Graham T, King RK, Rahn K, Read S. Use of the flagellar H7 gene as a target in multiplex PCR assay and improved specificity in identification of enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains. J Clin Microbiol 1997; 35: 656-652.

**PCR utilizada para la caracterización genotípica de STEC y *Escherichia coli* O157 no toxigénicos determinando la presencia del gen *saa***

Gen de virulencia	Primer	Secuencia DNA (5´- 3´)	Producto amplificado (bp)
<i>saa</i>	SAAD-F	CGTGATGAACAGGCTATTGC	119
	SAAD-R	ATGGACATGCCTGTGGCAAC	

**Mezcla PCR**

Volumen final: 50 µl

10x PCR buffer: 5 µl (Invitrogen)

dNTPs: 0,1mM de cada uno

MgCl<sub>2</sub>: 1,5 mM

Cebadores: 0,5 pmol/µl (de cada uno)

Taq polimerasa (Invitrogen): 1,5 U

ADN molde: 2 µl

**Condiciones de PCR para la amplificación**

Desnaturalización Inicial: 5 min a 93° C

Desnaturalización: 1 min a 93° C

Pegado de cebadores: 1 min a 55° C

Extensión: 1 min a 72° C

Extensión final: 2 min a 72° C

} 25 ciclos

**Control positivo: *Escherichia coli* 14426**

### **Gel de Agarosa al 2 %**

**Referencia:** Paton AW, Srimanote P, Woodrow MC, Paton JC. Characterization of Saa, a novel autoagglutinating adhesion produced by locus of enterocyte effacement negative shiga-toxigenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans. Infect Immun 2001; 69: 6999-7009.

**PCR múltiple utilizada para la caracterización genotípica de ETEC, STEC y *Escherichia coli* O157 no toxigénicos determinando la presencia de los genes *eltA*, *fasA* y *estII* que codifican la producción de las toxinas LT, STb y la adhesina fimbrial F6**

Genes de virulencia	Primer	Secuencia DNA (5´- 3´)	Producto amplificado (bp)
<i>eltA</i>	LTA-1	GGCGACAGATTATACCGTGC	696
	LTA-2	CCGAATTCTGTTATATATGTC	
<i>fasA</i>	F6-Fw	TCTGCTCTTAAAGCTACTGG	333
	F6-Rv	AACTCCACCGTTTGTATCAG	
<i>estII</i>	STb-1	ATCGCATTCTTCTTGCATC	172
	STb-2	GGGCGCCAAAGCATGCTCC	

### **Mezcla PCR**

Volumen final: 25 µl  
 10x PCR buffer: 2,5 µl (Invitrogen)  
 dNTPs: 200 µM  
 MgCl<sub>2</sub>: 2 mM (Invitrogen)  
 Cebadores: 3,2 pmol (de cada uno)  
 Taq polimerasa (Invitrogen): 1,25 U  
 ADN molde: 2 µl

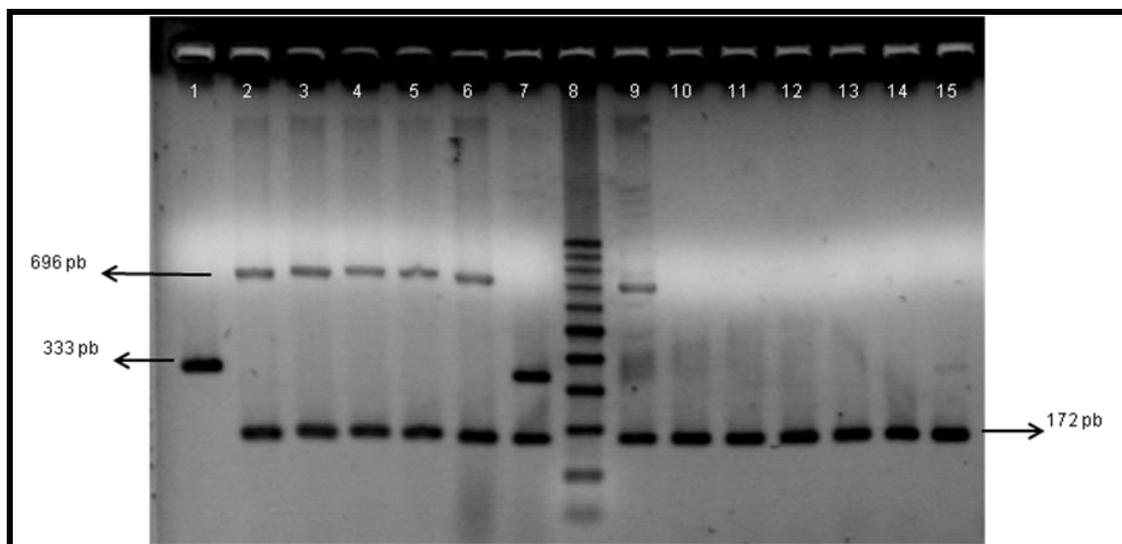
### **Condiciones de PCR para la amplificación**

Desnaturalización Inicial: 5 min a 94° C  
Desnaturalización: 1 min a 94° C  
Pegado de cebadores: 1 min a 58° C  
Extensión: 1 min a 72° C  
Extensión final: 7 min a 72° C

} 30 ciclos

**Controles positivos:** *E. coli* 81603 A *fasA*<sup>+</sup>/*estII*<sup>+</sup>

*E. coli* 7805 *estI*<sup>+</sup>/*faeG*<sup>+</sup>/*eltA*<sup>+</sup>/*estII*<sup>+</sup>/*astA*.

**Gel de Agarosa al 2 %**

**Productos amplificados por PCR para la detección de los genes *eltA*, *estII*, *fasA* en ETEC de origen porcino.** Línea 1: ETEC *fasA*<sup>+</sup> aislado de un cerdo clínicamente sano. Líneas 2, 3, 4, 5 y 6: ETEC *eltA*<sup>+</sup>/*estII*<sup>+</sup>, aislados de cerdos clínicamente sanos. Línea 7: control positivo *E. coli* 81603 A *fasA*<sup>+</sup>/*estII*<sup>+</sup>. Línea 8: marcador de tamaño molecular Cien Marker. Línea 9: control positivo *E. coli* 7805 *eltA*<sup>+</sup>/*estII*<sup>+</sup>. Líneas 10, 11, 12, 13, 14 y 15 ETEC *estII*<sup>+</sup>, aislados de cerdos clínicamente sanos.

**Referencia:** Chapman T, Wu X, Barchia I, Bettelheim K, Driesen S, Trott D, Wilson M, Chin JJ. Comparison of virulence gene profiles of *Escherichia coli* strains isolated from healthy and diarrheic swine. *Appl Environ Microbiol* 2006; 72: 4782-4795.

**PCR múltiple utilizada para la caracterización genotípica de ETEC, STEC y *Escherichia coli* O157 no toxigénicos determinando la presencia de los genes *faeG*, *fanC* y *estI* que codifican la producción de las adhesinas fimbriales F4, F5 y la toxina STa**

Genes de virulencia	Primer	Secuencia DNA (5' - 3')	Producto amplificado (bp)
<i>faeG</i>	F4-Fw	GGTGATTTCAATGGTTTCG	764
	F4-Rv	ATTGCTACGTTTCAGCGGAGCG	
<i>fanC</i>	F5-Fw	TGGGACTACCAATGCTTCTG	450
	F5-Rv	TATCCACCATTAGACGGAGC	
<i>estI</i>	STa-1	TCTTTCCCCTCTTTTAGTCAG	166
	STb-2	ACAGGCAGGATTACAACAAAG	

**Mezcla PCR**

Volumen final: 25 µl

10x PCR buffer: 2,5 µl (Invitrogen)

dNTPs: 200 µM

MgCl<sub>2</sub>: 2 mM (Invitrogen)

Cebadores: 3,2 pmol (de cada uno)

Taq polimerasa (Invitrogen): 1,25 U

ADN molde: 2 µl

**Condiciones de PCR para la amplificación**

Desnaturalización Inicial: 5 min a 94° C

Desnaturalización: 1 min a 94° C

Pegado de cebadores: 1 min a 58° C

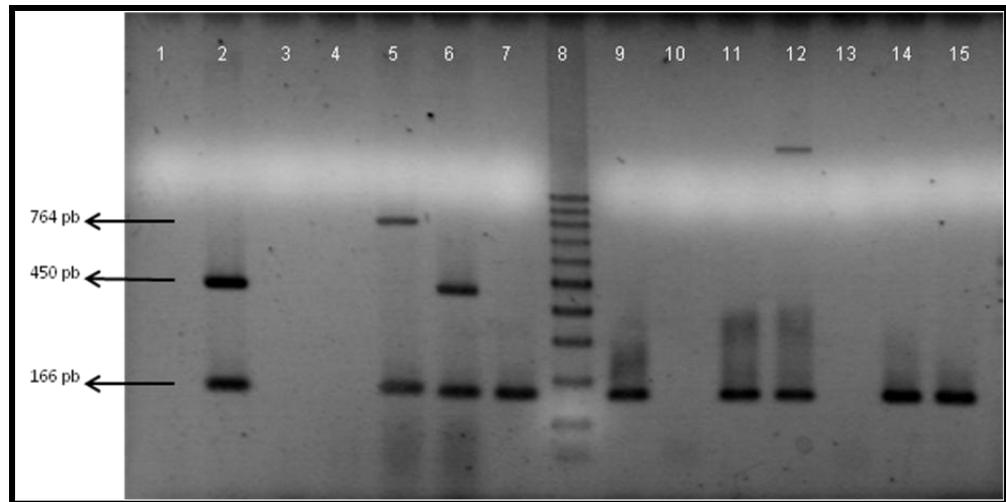
Extensión: 1 min a 72° C

Extensión final: 7 min a 72° C

} 30 ciclos

**Controles positivos:** *E. coli* 7805 *estI*<sup>+</sup>/*faeG*<sup>+</sup>/*eltA*<sup>+</sup>/*estII*<sup>+</sup>/*astA*.

*E. coli* 1073 B44 *estI*<sup>+</sup>/*fanC*/*F41*<sup>+</sup>

**Gel de Agarosa al 2 %**

**Productos amplificados por PCR para la detección de los genes *estI*, *faeG* y *fanC* en ETEC de origen porcino.** Líneas 1: control de reactivo (mezcla sin ADN molde). Línea 2: ETEC *estI<sup>+</sup>/fanC<sup>+</sup>* aislado de un cerdo clínicamente sano. Líneas 3, 4, 10 13: ETEC *estI<sup>-</sup>/faeG<sup>-</sup>/fanC<sup>-</sup>* aislados de cerdos clínicamente sanos. Línea 5: control positivo *E. coli* 7805 *estI<sup>+</sup>/faeG<sup>+</sup>*. Línea 6: control positivo *E. coli* 1073 B44 *estI<sup>+</sup>/fanC<sup>+</sup>*. Líneas 7, 9, 11, 12, 14 y 15: ETEC *estI<sup>+</sup>* aislados de cerdos clínicamente sanos. Línea 8: marcador de tamaño molecular Cien Marker.

**Referencia:** Chapman T, Wu X, Barchia I, Bettelheim K, Driesen S, Trott D, Wilson M, Chin JJ. Comparison of virulence gene profiles of *Escherichia coli* strains isolated from healthy and diarrheic swine. Appl Environ Microbiol 2006; 72: 4782-4795.

**PCR múltiple utilizada para la caracterización genotípica de ETEC, STEC y *Escherichia coli* O157 no toxigénicos determinando la presencia de los genes *faeG*, *fanC* y *estI* que codifican la producción de las adhesinas fimbriales F18 y F41**

Genes de virulencia	Primer	Secuencia DNA (5'- 3')	Producto amplificado (bp)
<i>fedA</i>	FedA-1	GTGAAAAGACTAGTTTATTTTC	510
	FedA-2	CTTGTAAGTAACCGCGTAAGC	
<i>F41</i>	F41-Fw	GAGGGACTTTTCATCTTTTAG	431
	F41-Rv	AGTCCATTCCATTTATAGGC	

**Mezcla PCR**

Volumen final: 25 µl

10x PCR buffer: 2,5 µl (Invitrogen)

dNTPs: 200 µM

MgCl<sub>2</sub>: 2 mM (Invitrogen)

Cebadores: 3,2 pmol (de cada uno)

Taq polimerasa (Invitrogen): 1,25 U

ADN molde: 2 µl

**Condiciones de PCR para la amplificación**

Desnaturalización Inicial: 5 min a 94° C

Desnaturalización: 1 min a 94° C

Pegado de cebadores: 1 min a 58° C

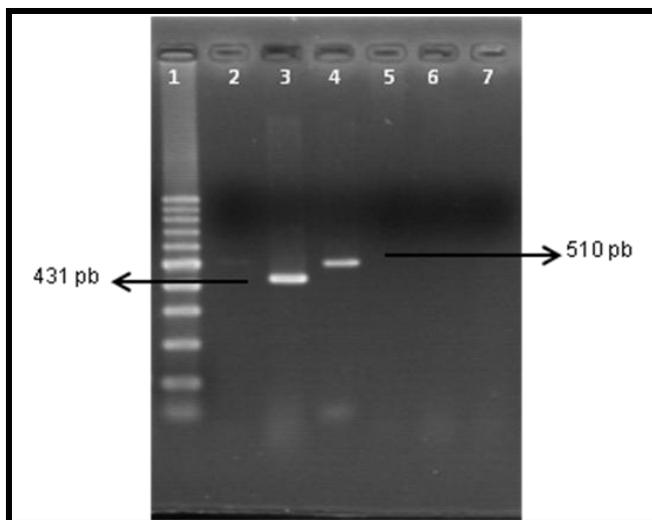
Extensión: 1 min a 72° C

Extensión final: 7 min a 72° C

} 30 ciclos

**Controles positivos:** *E. coli* 1033 88-1199 *fedA*<sup>+</sup>

*E. coli* 1073B44 *F41*<sup>+</sup>/*estI*<sup>+</sup>/*fanC*<sup>+</sup>

**Gel de Agarosa al 2 %****Productos amplificados por PCR para la detección de los genes *fedA* y *F41* en ETEC**

**de origen porcino.** Línea 1: marcador de tamaño molecular Cien Marker. Línea 2: control positivo *E. coli* 1033 88-1199 *fedA*<sup>+</sup>. Línea 3: control positivo *E. coli* 1073B44 *F41*<sup>+</sup>. Línea 4: ETEC *fedA*<sup>+</sup> aislada de un cerdo clínicamente sano. Líneas 5 y 6: ETEC *fedA*<sup>-</sup>/*F41*<sup>-</sup> aislados de cerdos clínicamente sanos. Línea 7: control de reactivo (mezcla sin ADN molde).

**Referencia:** Chapman T, Wu X, Barchia I, Bettelheim K, Driesen S, Trott D, Wilson M, Chin JJ. Comparison of virulence gene profiles of *Escherichia coli* strains isolated from healthy and diarrheic swine. *Appl Environ Microbiol* 2006; 72: 4782-4795.

**PCR múltiple utilizada para la caracterización genotípica de ETEC, STEC y *Escherichia coli* O157 no toxigénicos determinando la presencia del gen *astA* que codifican la producción de la toxina termoestable EAST**

Gen de virulencia	Primer	Secuencia DNA (5' - 3')	Producto amplificado (bp)
<i>astA</i>	east 11a	CCATCAACACAGTATATCCGA	111
	east 11b	GGTCGCGAGTGACGGCTTTGT	

**Mezcla PCR**

Volumen final: 50 µl

10x PCR buffer: 5 µl (Invitrogen)

dNTPs: 200 µM

MgCl<sub>2</sub>: 1,5 mM (Invitrogen)

Cebadores: 50 pmol (de cada uno)

Taq polimerasa (Invitrogen): 1 U

ADN molde: 2 µl

**Condiciones de PCR para la amplificación**

Desnaturalización Inicial: 3 min a 94° C

Desnaturalización: 30 seg a 94° C

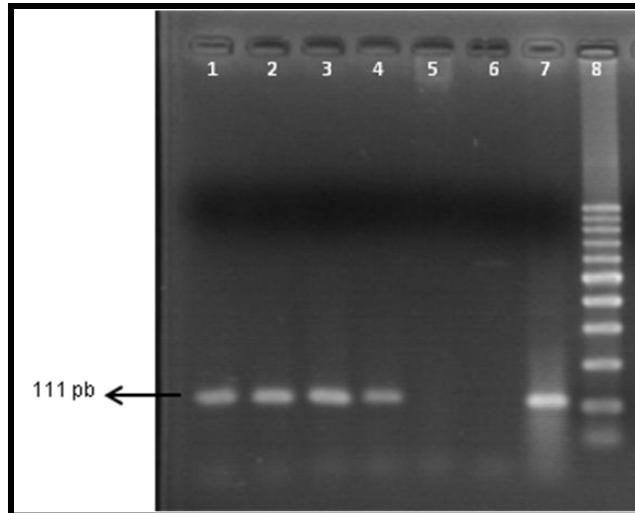
Pegado de cebadores: 30 seg a 45° C

Extensión: 30 seg a 72° C

Extensión final: 10 min a 72° C

} 30  
ciclos

**Control positivo**: *E. coli* 7805 *estI*<sup>+</sup>/*faeG*<sup>+</sup>/*eltA*<sup>+</sup>/*estII*<sup>+</sup>/*astA*

**Gel de Agarosa al 2 %**

**Productos amplificados por PCR para la detección del gen *astA* en ETEC de origen porcino.** Línea 1: ETEC *astA*<sup>+</sup> aislado de un cerdo clínicamente sano. Línea 2: EAEC *astA* aislado de un cerdo clínicamente sano. Líneas 3 y 4: STEC *astA*<sup>+</sup> aislado de cerdos clínicamente sanos. Línea 5: *E. coli astA*<sup>-</sup> aislado de un cerdo clínicamente sano. Línea 6: control de reactivo (mezcla sin ADN molde). Línea 7: control positivo *E. coli* 7805 *astA*<sup>+</sup>. Línea 8: marcador de tamaño molecular Cien Marker.

**Referencia:** Chapman T, Wu X, Barchia I, Bettelheim K, Driesen S, Trott D, Wilson M, Chin JJ. Comparison of virulence gene profiles of *Escherichia coli* strains isolated from healthy and diarrheic swine. *Appl Environ Microbiol* 2006; 72: 4782-4795.

**PCR utilizada para la caracterización genotípica de ETEC, STEC y *Escherichia coli* O157 no toxigénicos determinando la presencia del gen *paa* que codifican la producción de la adhesina no fimbrial Paa**

Gen de virulencia	Primer	Secuencia DNA (5'- 3')	Producto amplificado (bp)
<i>paa</i>	Paa-Fw	ATGAGGAAACATAATGGCAGG	350
	Paa-Rv	TCTGGTCAGGTCGTCAATAC	

**Mezcla PCR**

Volumen final: 50 µl

10x PCR buffer: 5 µl (Invitrogen)

dNTPs: 400 µl

MgCl<sub>2</sub>: 4 mM (Invitrogen)

Cebadores: 50 pmol (de cada uno)

Taq polimerasa (Invitrogen): 1 U

ADN molde: 2 µl

**Condiciones de PCR para la amplificación**

Desnaturalización Inicial: 2 min a 94° C

Desnaturalización: 30 seg a 94° C

Pegado de cebadores: 45 seg a 62° C

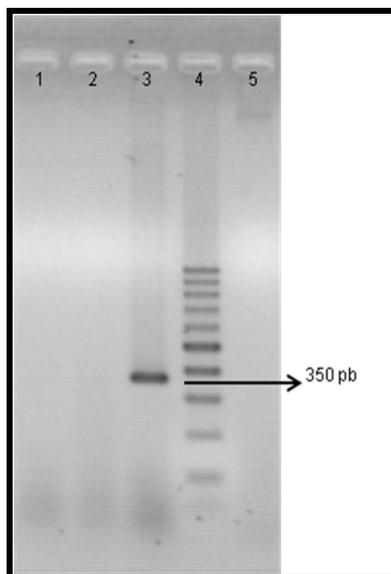
Extensión: 30 seg a 72° C

Extensión final: 7 min a 72° C

} 30 ciclos

**Control positivo: *E. coli* ED933**

### Gel de Agarosa al 2 %



**Producto amplificado por PCR para la detección del gen *paa***. Líneas 1 y 2: ETEC porcinos *paa*<sup>-</sup>. Línea 3: control positivo *E. coli* ED933. Línea 4: marcador de tamaño molecular Cien Marker. Línea 5: control de reactivo (mezcla sin ADN molde).

**Referencia:** Chapman T, Wu X, Barchia I, Bettelheim K, Driesen S, Trott D, Wilson M, Chin JJ. Comparison of virulence gene profiles of *Escherichia coli* strains isolated from healthy and diarrheic swine. *Appl Environ Microbiol* 2006; 72: 4782-4795.

**PCR utilizada para la caracterización genotípica de ETEC, STEC y *Escherichia coli* O157 no toxigénicos determinando la presencia del gen *aidA* que codifican la producción de la adhesina no fimbrial AIDA-I**

Gen de virulencia	Primer	Secuencia DNA (5´- 3´)	Producto amplificado (bp)
<i>aidA</i>	AIDA-I-F	ACAGTATCATATGGAGCCA	585
	AIDA-I-R	TGTGCGCCAGAACTATTA	

**Mezcla PCR**

Volumen final: 50 µl

10x PCR buffer: 5 µl (Invitrogen)

dNTPs: 0,2 µM de cada dNTP

MgCl<sub>2</sub>: 2,5 µM

Cebadores: 40 pmol (de cada uno)

Taq polimerasa (Invitrogen): 1,25 U

ADN molde: 2 µl

**Condiciones de PCR para la amplificación**

Desnaturalización Inicial: 3 min a 94° C

Desnaturalización: 30 seg a 94° C

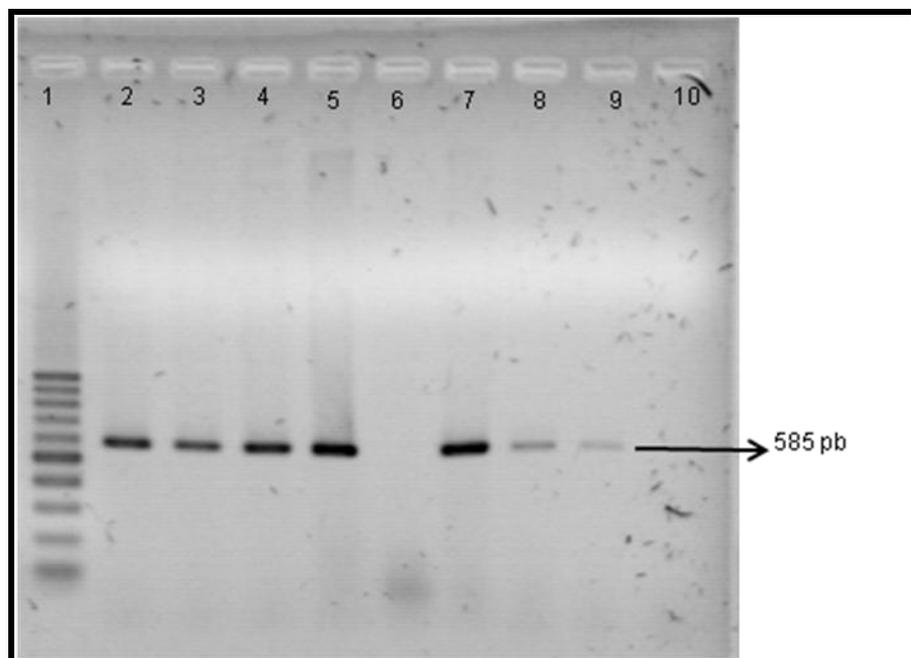
Pegado de cebadores: 30 seg a 60° C

Extensión: 30 seg a 72° C

Extensión final: 5 min a 72° C

} 35 ciclos

**Control positivo**: ETEC O157 *aidA*<sup>+</sup>

**Gel de Agarosa al 2 %****Productos amplificados por PCR para la detección del gen *aidA* en *E. coli* O157****toxigénicos y no toxigénicos de origen porcino.** Línea 1: marcador de tamaño molecular Cien

Marker. Líneas 2, 8 y 9: STEC *aidA*<sup>+</sup>. Líneas 3 y 7: ETEC *aidA*<sup>+</sup>. Línea 4: control positivo ETEC O157 *aidA*<sup>+</sup>. Línea 5: *E. coli* O157 no toxigénico *aidA*<sup>+</sup>. Línea 6: ETEC *aidA*<sup>-</sup>. Línea 10: control de reactivo (mezcla sin ADN molde).

**Referencia:** Ngeleka M, Pritchard J, Appleyard G, Middleton D, Fairbrother J. Isolation and association of *Escherichia coli* AIDA-I/STb, rather than EAST1 pathotype, with diarrhea in piglets and antibiotic sensitivity of isolates. J Vet Diagn Invest 2003; 15: 242-252.