



**FACULTAD DE  
CIENCIAS VETERINARIAS**  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**  
**Facultad de Ciencias Veterinarias**

**Trabajo de Tesis realizado como requisito para optar al título de  
DOCTOR EN CIENCIAS VETERINARIAS**

**DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE  
*Escherichia coli* O157 DE GANADO BOVINO  
FAENADO EN FRIGORÍFICOS DE LA ARGENTINA**

**AUTOR:** DEL CASTILLO, Lourdes Leonor

**DIRECTOR:** MASANA, Marcelo Oscar

**CODIRECTOR:** LEOTTA, Gerardo Aníbal

**LUGAR DE TRABAJO:** Instituto de Tecnología de Alimentos (ITA),  
Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA)

**MIEMBROS DEL JURADO:**

CATALDI, Ángel

LÓPEZ, Oscar Clemente Florentino

STANCHI, Nestor

**2014**

Noni.

Feliz cumpleaños

T. Nina.

Adorosa que es.

11/02/02

Noni.

Feliz cumpleaños

T. Nina.

Adorosa que es

11/02/02

Noni.

Feliz cumpleaños

T. Nina.

Adorosa que es.

11/02/02

Noni.

Feliz cumpleaños

T. Nina.

Adorosa que es

11/02/02

Noni.

Feliz cumpleaños

T. Nina.

Adorosa que es

11/02/02

Noni.

Feliz cumpleaños

T. Nina.

Adorosa que es

11/02/02

**En homenaje a mi amada tía Nora!**

## AGRADECIMIENTOS

La culminación de este trabajo de Tesis, también representa para mí un poco el cierre de una etapa muy importante de mi vida, con hermosos recuerdos y con una gran cantidad de personas con la que compartí el camino, por lo que resulta bastante difícil comenzar a agradecer sin tener temor a olvidarse de alguien....

Para comenzar quiero agradecer al INTA, que si bien no es una persona, es la Institución a la que pertenezco, y la que me brindó muchas oportunidades y diferentes experiencias. Entre ellas, la de poder realizar este Posgrado! Dentro de esta institución, quiero agradecer principalmente a mi Director de tesis y jefe del laboratorio de Microbiología de Alimentos, Marcelo Masana. Quiero darle mi sincero agradecimiento por su generosidad al brindarme dedicación, tiempo, conocimientos y enseñanzas, y sobre todo confianza a nivel intelectual, pero también quiero agradecerle las charlas, los intercambios de ideas, opiniones, anécdotas y el compartir diario de la vida.

Justamente hablando de compartir la vida, debo decir que para una persona del interior en Buenos Aires, sin familia cerca..., fueron muy importantes mis Queridos Compañeros del Instituto de Alimentos del INTA...Mis Amigos!, mi familia postiza, mis compañeros de laboratorio, a los cuales también quiero agradecerles por esa amistad y por estar en lo buenos y malos momentos. No voy a nombrar a todos, porque son muchos, pero todos saben lo importante que fueron para mí! Sin embargo, si me gustaría mencionar a algunos que tuvieron especial participación en este trabajo de tesis: Muchísimas gracias Don Ortigoza, pilar del laboratorio y materia dispuesta siempre para trabajar! También agradecerle a Martín, compañero de laboratorio y de largos ensayos, y a Anita (Sancho), quien siempre me ayudó con mis consultas de manera desinteresada.

También quiero agradecerle a Gerardo Leotta, Codirector de esta Tesis, por brindarme generosamente su ayuda, sus conocimientos, su estímulo, su predisposición, y sobre todo por su gran positividad, que fueron fundamentales para terminar este trabajo!

A Marta Rivas, por abrirme las puertas del Servicio de Fisiopatogenia del Instituto Malbrán, por aceptarme como pasante y como una compañera más! Gracias a Marta y a todos los compañeros del Servicio (Caroleta, Isa, Eli, Beatriz, Ariela, Naty, Lucía, Eduardo y al mismo Gerardo). Ellos me otorgaron generosamente sus conocimientos y también compartimos trabajo codo a codo, risas y tristezas, comidas y amistad.

Particularmente, quiero agradecerle al Profesor de la Cátedra de Bioestadística de la Facultad de Cs Veterinarias de UNLP, Miguel Atilio Risso, por su valiosa ayuda y colaboración desinteresada en el análisis estadístico de una parte de los resultados de este trabajo.

A mis actuales compañeros de trabajo de la Agencia Cafayate y de la Experimental Salta del INTA, por todo su apoyo y por promover la culminación de este trabajo, y en particular a Diego Kalman, por su amable ayuda con algunos gráficos.

A mi querida familia, mi madre, mi padre, mis hermanos y mis abuelos, quiero agradecerles por todo el esfuerzo que hicieron para que estudie lejos de casa y porque siempre estuvieron apoyándome en mis elecciones de vida. Y a mi familia de La Plata, que me abrieron las puertas de su hogar, me llenaron de cariño y me permitieron compartir con ellos la vida misma!

A mi amor, Cristián, y a mis princesas, Monserrat y Amparo, quiero agradecerles por la felicidad y el amor que me dan todos los días, pero en especial por la paciencia y el aguante, sobre todo en el último tramo de este trabajo de Tesis.

**MUCHISIMAS GRACIAS A TODOS!!!!**

Lourdes (Noni)

**PUBLICACIONES PARCIALES**

- Prevalence, Characterization, and Genotypic Analysis of *Escherichia coli* O157:H7/NM from Selected Beef Exporting Abattoirs of Argentina. Masana MO, Leotta GA, Del Castillo LL, D'Astek BA, Palladino PM, Galli L, Vilacoba E, Carbonari C, Rodriguez HR, Rivas M. J Food Prot. 2010; 73 (4): 649-656.
  
- Subtyping of *Escherichia coli* O157:H7 Strains Isolated from Human Infections and Healthy Cattle in Argentina. D'Astek BA, Del Castillo LL, Miliwebsky E, Carbonario C, Palladino PM, Deza N, Chinen I, Manfredi E, Leotta GA, Masana MO, Rivas M. Foodborne Pathog Dis. 2012; 9 (5): 457-464.

**TABLA DE CONTENIDOS**

	<b>Página</b>
PORTADA.....	I
DEDICATORIA .....	II
AGRADECIMIENTOS .....	III
PUBLICACIONES PARCIALES .....	V
TABLA DE CONTENIDOS .....	VI
INDICE .....	VII
FIGURAS .....	IX
TABLAS.....	X
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.....	XI
UNIDADES DE MEDIDAS.....	XVII

## INDICE

	<b>Página</b>
<b>RESUMEN Y PALABRAS CLAVES</b> .....	1
<b>SUMMARY AND KEYWORDS</b> .....	2
1. INTRODUCCIÓN .....	3
1.1. <i>Escherichia coli</i> como agente de enfermedad humana .....	3
1.2. Manifestaciones clínicas de STEC O157 .....	5
1.3. Patogénesis de STEC .....	7
1.3.1. Marcadores de virulencia de STEC .....	9
1.4. Resistencia y adaptación al estrés .....	16
1.5. Evolución de la <i>Escherichia coli</i> O157:H7 .....	26
1.6. Herramientas epidemiológicas actuales .....	28
1.7. Ecología de <i>E. coli</i> O157 .....	31
1.7.1. Reservorio y vías de transmisión de <i>E. coli</i> O157 .....	31
1.8. El SUH y la cadena de la carne en la Argentina .....	34
1.8.1. Situación actual del SUH .....	34
1.8.2. Antecedentes de <i>E. coli</i> O157 en la cadena de la carne .....	35
1.8.3. Situación de la Cadena de la Carne Argentina .....	37
2. OBJETIVOS .....	38
2.1. Objetivo General .....	38
2.2. Objetivos específicos .....	38
3. MATERIALES Y MÉTODOS .....	40
3.1. <b>Estimación de la Prevalencia de <i>E. coli</i> O157 en ganado bovino faenado en frigoríficos de la Argentina</b> .....	40
3.1.1. Determinación de Prevalencia en Materia Fecal y Carcasa. Diseño del ensayo .....	40
3.1.2. Procedimiento de Muestreo de Materia Fecal (MF) .....	41
3.1.3. Procedimiento de muestreo de Carcasa (CA) .....	42
3.1.4. Método de detección de <i>E. coli</i> O157 .....	44
3.2. <b>Caracterización de los aislamientos de <i>E. coli</i> O157 obtenidos para conocer su potencial patogénico y sus características epidemiológicas</b> .....	52
3.2.1. Identificación bioquímica general .....	53
3.2.2. Biotipificación .....	54
3.2.3. Producción de Enterohemolisina .....	55
3.2.4. Producción de Toxina Shiga .....	55

3.2.5.	Sensibilidad a antimicrobianos .....	56
3.2.6.	Serotipificación .....	56
3.2.7.	Detección genotípica de factores de virulencia.....	57
3.2.8.	Determinación de las variantes de toxina Shiga .....	57
3.2.9.	Fagotipificación .....	58
3.2.10.	Subtipificación molecular de los aislamientos .....	58
3.3.	<b>Estimación de la respuesta al estrés ácido de los aislamientos obtenidos .....</b>	<b>60</b>
3.3.1.	Ensayo de Resistencia Ácida (RA) .....	60
3.3.2.	Análisis de la respuesta de RA.....	63
4.	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>64</b>
4.1.	<b>Estimación de la Prevalencia de <i>E. coli</i> O157 en ganado bovino faenado en frigoríficos de la Argentina .....</b>	<b>64</b>
4.1.1.	Prevalencia de <i>E. coli</i> O157.....	64
4.1.2.	Caracterización de las muestras .....	67
4.1.3.	Influencia del establecimiento muestreado .....	72
4.1.4.	Distribución por lotes y por animal.....	74
4.1.5.	Estacionalidad .....	75
4.1.6.	Sistema productivo.....	77
4.2.	<b>Caracterización de los aislamientos de <i>E. coli</i> O157 obtenidos para conocer su potencial patogénico y sus características epidemiológicas.....</b>	<b>79</b>
4.2.1.	Caracterización fenotípica de los aislamientos .....	79
4.2.2.	Virulencia de las cepas aisladas .....	80
4.2.3.	Subtipificación de los aislamientos.....	82
4.3.	<b>Estimación de la respuesta al estrés ácido de los aislamientos obtenidos .....</b>	<b>90</b>
5.	<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>98</b>
6.	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>137</b>
6.1.	Este trabajo describe y cuantifica la contaminación de <i>E. coli</i> O157 existente en ganado de carne en las condiciones de producción entre el año 2005 al 2008 de la industria frigorífica de Argentina.....	137
6.2.	Se caracterizaron todos los aislamientos obtenidos feno y genotípicamente para conocer su potencial patogénico y sus características epidemiológicas.....	139
6.3.	Se caracterizó fenotípicamente la respuesta al estrés ácido de las cepas <i>E. coli</i> O157 aisladas de bovinos.....	142
7.	<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>146</b>

## FIGURAS

Figura 1: Proceso de patogénesis de STEC .....	8
Figura 2: Modo de acción de los sistemas de RA basados en la descarboxilación de aminoácidos.....	22
Figura 3: Modelo evolutivo propuesto por Feng y col. (1998) en la emergencia de <i>E. coli</i> O157:H7 ..	28
Figura 4: Formas de transmisión de STEC, rol central del ganado como reservorio.....	33
Figura 5: Toma de muestra de MF en la bandeja de vísceras verdes.....	42
Figura 6: Esquema de la superficie de esponjado de la zona anterior y posterior de la carcasa .....	43
Figura 7: Toma de muestra de CA .....	44
Figura 8: Esquema simplificado del tratamiento de las muestras en el laboratorio .....	45
Figura 9: Diagrama del procedimiento de SIM .....	47
Figura 10: Procedimiento para realizar la separación inmunomagnética (SIM) de las <i>E. coli</i> O157:H7/NM en el laboratorio .....	48
Figura 11: Productos de amplificación por PCR para la detección de los genes <i>stx</i> <sub>1</sub> , <i>stx</i> <sub>2</sub> y <i>rfb</i> <sub>O157</sub> en cepas de referencia y en STEC .....	50
Figura 12: Esquema de recuperación de cepas y confirmación de muestras presuntamente <i>E. coli</i> O157 positivas (STEC O157 y EC O157 TSN) por PCR múltiple a partir de las zonas de confluencia de los medios selectivos.....	52
Figura 13: Esquema del ensayo para la determinación de RA.....	61
Figura 14: Distribución de las STEC O157 y EC O157 TSN de acuerdo al tipo de animal muestreado .....	69
Figura 15: Mapa de localización geográfica de los departamentos de origen de la hacienda.....	70
Figura 16: Mapa de distribución geográfica de la prevalencia de STEC O157 por provincias .....	71
Figura 17: Evolución mensual de la contaminación de los animales (MF) .....	76
Figura 18: Evolución estacional de la contaminación de los animales (MF).....	77
Figura 19: Dendograma de las cepas STEC O157 por <i>Xba</i> I-PFGE.....	83
Figura 20: Dendograma de las cepas EC O157 TSN aisladas, obtenido por <i>Xba</i> I-PFGE .....	86
Figura 21: Dendograma de todas las cepas de <i>E. coli</i> O157 aisladas (STEC y EC O157 TSN) .....	88
Figura 22: Ejemplo de recuentos para la respuesta al desafío ácido de una cepa STEC O157 y una EC O157 TSN en los tiempo inicial (0h) y final (6h) por los 3 mecanismos de RA y el Control (C).....	91
Figura 23: Gráfico de BoxPlot de los NRL de las STEC O157 y EC O157 TSN por mecanismo de RA analizado .....	93
Figura 24: Distribución de frecuencia de las cepas STEC O157 y EC O157 TSN de acuerdo con la respuesta para los sistemas RA1, RA2, RA3 y Control (C).....	94
Figura 25: Comparación de los porcentajes de prevalencia en ganado bovino encontrados en distintas regiones del mundo .....	107
Figura 26: Comparación de los porcentajes de prevalencia de carcasas bovinas encontrados en distintas regiones del mundo a nivel de playa de faena .....	115

## TABLAS

Tabla 1: Pruebas bioquímicas básicas para diferenciar cepas del género <i>Escherichia</i> .....	54
Tabla 2: Biotipos de <i>E. coli</i> O157:H7 de acuerdo a la fermentación de azúcares .....	54
Tabla 3: Prevalencia de <i>E. coli</i> O157 en materias fecales (MF) y carcasas (CA) en el ganado bovino	65
Tabla 4: Cantidad de muestras presuntivas y confirmadas por tipo de muestras y porcentaje de recuperación.....	66
Tabla 5: Caracterización de la hacienda faenada de acuerdo al tipo de animal y raza .....	68
Tabla 6: Distribución de Prevalencia de <i>E. coli</i> O157, STEC O157 y EC O157 TSN en MF y CA, de acuerdo al frigorífico muestreado .....	73
Tabla 7: Distribución del nivel de contaminación de los lotes como número de animales con MF positivas de seis bovinos analizados .....	74
Tabla 8: Relaciones entre lotes positivos para STEC O157 y EC O157 TSN a la entrada (MF) y a la salida (CA) de la faena.....	75
Tabla 9: Relaciones entre MF y CA positivas para STEC O157 de los animales muestreados .....	75
Tabla 10: Muestras analizadas y confirmadas para <i>E. coli</i> O157 y STEC O157 discriminadas por tipo de establecimiento de origen.....	77
Tabla 11: Resumen de características fenotípicas de las cepas STEC O157 y EC O157 TSN aisladas	79
Tabla 12: Susceptibilidad a antibiótico (Atb) de las cepas de <i>E. coli</i> O157 .....	80
Tabla 13: Genotipos de virulencia de las cepas aisladas de materia fecal (MF) y carcasas (CA) .....	81
Tabla 14: Descripción de las características de los clusters de STEC O157 .....	85
Tabla 15: Valores de NRL obtenidos por los diferentes mecanismos de RA ensayados.....	90
Tabla 16: Número de Reducciones Logarítmicas (NRL) promedio para cada sistema de RA y de acuerdo con el tipo de cepa estudiado.....	92
Tabla 17: Comparación de los perfiles de virulencia de las cepas <i>E. coli</i> O157 con la respuesta de RA .....	97
Tabla 18: Selección de estudios sobre prevalencia de STEC O157 en materia fecal bovina .....	106
Tabla 19: Selección de estudios en diferentes países de STEC O157 en canales a nivel de frigorífico .....	114

## ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

A/E	Adhesión y barrido o erosión ( <i>attachment and effacement</i> )
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AKN	Amikacina
AMP	Ampicilina
AMPc	Adenosin mono-fosfato cíclico
ANLIS	Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud
Arg	Arginina
ARN	Ácido ribonucleico
BrEt	Bromuro de etidio
BPM	Buenas Prácticas de Manufactura
BSC	Buffer de suspensión celular
C	Control
CA	Carcasa
CH	Colitis Hemorrágica
CIP	Ciprofloxacina
Cl <sup>-</sup>	Ión cloruro
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CMP	Cloramfenicol
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
COL	Colistina
CRP	Proteína receptora de AMPc
CS	Agar Citrato de Simmons
CT	Cefixime-telurito
DAEC	<i>Escherichia coli</i> de adherencia difusa ( <i>diffuse-adherent E. coli</i> )
dNTP	Desoxinucleótido trifosfato
EAEC	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativo ( <i>enteroaggregative E. coli</i> )
EC	<i>Escherichia coli</i>

ECm	Caldo <i>Escherichia coli</i> modificado
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EDTA	Ácido etilen-diamino-tetra-acético
EEUU	Estados Unidos de Norteamérica
EfaI	Factor de <i>E. coli</i> enterohemorrágico para la adherencia-1
EG	Caldo de medio mínimo con Glucosa
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágico ( <i>enterohemorrhagic E. coli</i> )
EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasivo ( <i>enteroinvasive E. coli</i> )
EMB	Agar Eosina Azul de Metileno
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatógeno ( <i>enteropathogenic E. coli</i> )
Esp	Proteína de secreción de <i>Escherichia coli</i> ( <i>E. coli secreted proteins</i> )
ETA	Enfermedades Transmitidas por Alimentos
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénico ( <i>enterotoxigenic E. coli</i> ).
FDA	Administración de Alimentos y Drogas de EEUU
FS	Fermentadoras de Sorbitol
FSIS	Servicio de Inspección y Seguridad Alimentaria de EEUU( <i>Food Safety and Inspection Service</i> )
GABA	Ácido gamma-aminobutírico ( <i>Gamma-aminobutyric acid</i> )
GadC	Antiporte putativo de Glutamato-GABA
Gb3	Globotriosilceramida
GEN	Gentamicina
Glut	Glutamato
GN	Caldo para Gram negativos
H	Antígeno flagelar
H <sup>+</sup>	Protón o ión hidrógeno
HACCP	Análisis de peligros y puntos críticos de control ( <i>Hazard Analyses and Critical Control Points</i> )
Hela	Células en cultivo de tejido provenientes de epitelio uterino
Hly	Hemolisina
IC	Intervalo de confianza
ID-O157	Medio de cultivo cromogénico para aislamiento selectivo e

	identificación presuntiva de <i>E. coli</i> O157:H7
Iha	Adhesina homóloga a IrgA
INEI	Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas
INTA	Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
IMS	Indol Movilidad Sulfuro
IPCVA	Instituto de Promoción de la Carne Vacuna Argentina
ITA	Instituto de Tecnología de Alimentos
LA	Aglutinación en látex
LB	Caldo Luria Bertani
LB-G	Caldo Luria Bertani con glucosa
LB-M	Caldo Luria Bertani bufferado con ácido morfolinetanosulfónico
LEE	<i>Locus for enterocyte effacement</i>
LIA	Lisina Hierro Agar
Log	Logaritmo
LPF	Gran fimbria polar o fimbria polar larga
LPS	Lipopolisacáridos
M	Móviles
MF	Materia Fecal
MIO	Movilidad Indol Ornitina
MLST	<i>Multilocus sequence typing</i>
MUG	4-metilumbeliferil-beta-D-glucorónido
N°	Número
Na <sup>+</sup>	Ión Sodio
NAL	Ácido Nalidíxico
NC	No corresponde
NCCLS	<i>National Committee for Clinical Laboratory Standards</i>
ND	No determinado
nFS	No fermentadoras de sorbitol
Nf	Número final de recuento total de aerobios mesófilos

Ni	Número inicial de recuento total de aerobios mesófilos
NIT	Nitrofurantoína
NM	Inmóviles ó no móviles
NR	No registrado
NRL	Número de reducciones logarítmicas
NT	No tipificable
O	Antígeno somático
ON	Toda la noche ( <i>overnight</i> )
ONPG	Ortho-nitrofenil-beta-galatosido
PBS	Solución salina bufferada con fosfatos ( <i>phosphate-buffered saline</i> )
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PFGE	Electroforesis en campos pulsados ( <i>pulsed-field gel electrophoresis</i> )
pH	Potencial hidrógeno
pKa	Potencial de disociación de un ácido débil
PT	Fagotipo ( <i>phage type</i> )
PTT	Púrpura trombótica trombocitopénica
R	Resistente
RA	Resistencia Ácida
RF	Caldo Rojo fenol
RFLP	Fragmentos de restricción de longitud polimórfica ( <i>restriction fragment length polymorphism</i> )
RM/VP	Rojo de Metilo/Voges Proskauer
RpoS	Subunidad sigma de la ARN polimerasa ( <i>RNA polymerase sigma</i> )
S	Sensible
Saa	Adhesina autoaglutinante de STEC ( <i>STEC autoagglutinating adhesin</i> )
SENASA	Servicio Nacional de sanidad y calidad agroalimentaria
SIM	Separación Inmunomagnética
SMAC	MacConkey Sorbitol
SN	Sobrenadante
SNC	Sistema Nervioso Central

Sor	Sorbitol
STEC	<i>Escherichia coli</i> productor de toxina Shiga ( <i>Shiga toxin-producing E. coli</i> )
STR	Estreptomicina
Stx	Toxina Shiga
SUH	Síndrome urémico hemolítico
TA	Tolerancia ácida
TAE	Tris-Ácido Acético-EDTA
TBE	Tris-ácido Bórico-EDTA
TE	Tris-EDTA
TET	Tetraciclina
TIFF	<i>Tagged Image File Format</i>
Tir	Receptor translocado de intimina ( <i>translocated intimin receptor</i> )
TMS	Trimetoprima-sulfametoxazol
TSA	Agar Tripteína de Soja
TSN	Toxina Shiga negativas
TSC	Caldo Tripteína de Soja
TSI	Triple azúcar Hierro
UC	Agar Urea de Christensen
UPGMA	Método de agrupamiento de pares sin ponderar usando la media aritmética ( <i>Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean</i> )
USDA	Departamento de Agricultura de EEUU ( <i>U. S. Department Agriculture</i> )
UV	Luz Ultravioleta
Vero	Células epiteliales en cultivo de tejido de riñón de mono verde Africano
VT	Verotoxina
VTEC	<i>Escherichia coli</i> Verotoxigénico ( <i>Verotoxigenic E. coli</i> )
y col.	y colaboradores
z.c.	Zona de confluencia
$\alpha$ -Hly	Alfa-hemólisis
$\beta$ -glu	Beta-glucoronidasa
$\sigma^S$	Factor Sigma sustituto o alternativo

$\Delta$	Colonia
-	Negativo
<	Menor
>	Mayor
%	Porcentaje
+	Positivo

**UNIDADES DE MEDIDAS**

°	Grados
°C	Grados centígrados
cm <sup>2</sup>	Centímetros cuadrados
H	Horas
G	Gramos
kpb	Kilopares de bases
kDa	Kilodaltones
kg	Kilogramos
pb	Pares de bases
mg	Miligramos
MDa	Mega Daltones
µg	Microgramos
µl	Microlitros
min	Minutos
ml	Mililitros
mM	Milimolar
M	Molar
pmol	Picomoles
rpm	Revoluciones por minuto
seg	Segundos
Tn	Toneladas
U	Unidades
UFC	Unidades formadoras de colonias
u\$s	Dólares
V	Voltios

## RESUMEN Y PALABRAS CLAVES

### **Detección y caracterización de *Escherichia coli* O157 de ganado bovino faenado en frigoríficos de la Argentina.**

Prevalencia – Bovinos – *Escherichia coli* O157 – Genotipos – PFGE – Resistencia ácida

El principal objetivo fue estimar la prevalencia y caracterizar las *E. coli* O157 de ganado vacuno faenado en Argentina. Se recolectaron un total de 1622 muestras de heces y carcasas en 9 frigoríficos de exportación. Todas las muestras se sometieron a separación inmunomagnética y las cepas fueron identificadas por PCR múltiple (*rfb*<sub>O157</sub>, *stx*<sub>1</sub>, *stx*<sub>2</sub>). Se aislaron 54 STEC O157 y 48 *E. coli* O157 toxina Shiga negativas (EC O157 TSN), de las que se establecieron sus características fenotípicas, genotípicas y las variantes *stx*. La prevalencia promedio de STEC O157 en materia fecal fue de 4,1% y 2,6% en carcasa; mientras que para EC O157 TSN la incidencia fue de 4,7 y 2,6%; respectivamente. No se observaron diferencias significativas por el género o raza de los animales. Los terneros y vaquillonas presentaron mayores porcentajes de prevalencia de STEC O157 en heces (10,5 y 8,5%, respectivamente). Todas las STEC O157 aisladas albergaban los genes *stx*<sub>2</sub>, *eae*, *ehxA*, y *fliC*<sub>H7</sub> y sólo el 16,7% presentó el gen *stx*<sub>1</sub>. El genotipo prevalente fue el *stx*<sub>2</sub>/*stx*<sub>2c(vh-a)</sub>, que también es frecuente en los casos de SUH. Mediante *Xba*I-PFGE se obtuvieron 29 patrones diferentes y 11 clusters. En cinco oportunidades, las cepas de STEC O157 aisladas de las carcasas fueron idénticas a las cepas de materia fecal. También 7 cepas idénticas se aislaron de carcasas muestreadas en dos visitas consecutivas a dos frigoríficos. Cinco perfiles de fago tipo-PFGE-*stx* fueron coincidentes con perfiles de cepas recuperadas de SUH. Las técnicas de subtipificación molecular mostraron que las cepas EC O157 TSN presentan un origen filogenético diferente a STEC O157. Se cuantificó la resistencia ácida (RA) por 3 mecanismos y se determinó que el sistema Glutamato-dependiente proporciona mejor protección en desafío ácido. Las EC O157 TSN fueron, en promedio, más resistentes que las cepas STEC O157 por los sistemas descarboxilasa dependientes.

## SUMMARY AND KEYWORDS

### **Detection and characterization of *Escherichia coli* O157 isolated from cattle of abattoirs of Argentina.**

Prevalence- Cattle –*Escherichia coli* O157 – Genotypes – PFGE – Acid resistance

The main objective was to estimate the prevalence and characteristics of *E. coli* O157 in beef cattle at slaughter in Argentina. For this purpose, a total of 1,622 fecal and carcass samples were collected in nine beef exporting abattoirs. All samples were subjected to immunomagnetic separation. Identification was performed by multiplex PCR (*rfb*<sub>O157</sub>, *stx*<sub>1</sub>, *stx*<sub>2</sub>). Fifty four STEC O157 and 48 Shiga toxin negative *E. coli* O157 (EC O157 TSN) strains were isolated. Phenotypic and genotypic features were established, and the *stx* variants were determined. Average prevalence of STEC O157 in the fecal content was 4.1% and 2.6% in carcasses; while for EC O157 TSN the incidence was 4.7 and 1.1%, respectively. Significant difference between gender and breed of cattle were not observed. Calves and heifers presented higher percentages of STEC O157 prevalence in feces, 10.5 and 8.5%, respectively. All STEC O157 isolated harbored *stx*<sub>2</sub>, *eae*, *ehxA*, and *fliC*<sub>H7</sub> genes, while *stx*<sub>1</sub> was present in 16.7% of the strains. The prevalent genotype was *stx*<sub>2</sub>/*stx*<sub>2c(vh-a)</sub>, which is also prevalent in HUS cases. Twenty nine different patterns were obtained by *Xba*I-PFGE and were grouped in 11 clusters. In five cases, STEC O157 strains isolated from carcasses were identical by PFGE to strains of the fecal content. Seven identical strains were isolated from carcasses sampled in two consecutive slaughter visits. Five phage type-PFGE-*stx* profiles matched with profiles of strains recovered from HUS cases. Molecular subtyping techniques showed that EC O157 TSN strains were a set apart from STEC O157. The variation in acid resistance (AR) for the strains was quantified by three mechanisms of AR. The glutamate systems provided the best protection in the most acidic environment. EC O157 TSN strains were, on average, more acid resistant than the STEC O157 strains using amino acid decarboxylase-dependent systems.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. *Escherichia coli* como agente de enfermedad humana

*Escherichia coli* pertenece a la Familia *Enterobacteriaceae* y es habitante normal de la flora intestinal de humanos y animales de sangre caliente. La mayoría de las cepas de *E. coli* no son patógenas, sin embargo existen cepas patogénicas que producen enfermedades intestinales y extra intestinales. Las cepas asociadas a enfermedades gastrointestinales se agruparon en seis patotipos diferentes basados en factores de virulencia específicos, pruebas fenotípicas, mecanismos de patogenicidad y síntomas clínicos que producen. Los patotipos de las *E. coli* diarragénicos incluye: *E. coli* enteropatógeno (EPEC), *E. coli* enterotoxigénico (ETEC), *E. coli* enteroinvasivo (EIEC), *E. coli* enteroagregativo (EAEC), *E. coli* de adherencia difusa (DAEC), y por último, *E. coli* productor de toxina Shiga (STEC) o de Verotoxina (VTEC). En humanos, ETEC, EPEC y EAEC colonizan el intestino delgado, mientras que EIEC y STEC colonizan el intestino grueso.

Las STEC se caracterizan por producir una clase de citotoxinas que tienen capacidad de inhibir la síntesis de proteínas en células eucariotas. Estas toxinas fueron denominadas en un primer momento como Verotoxinas (VT) por su efecto citotóxico sobre células Vero (Knowalchuk y col., 1977). Pocos años después, se observó que también tenían efecto sobre células Hela, el que podía ser neutralizado por anticuerpos contra la toxina de *Shigella dysenteriae* tipo 1 (O'Brien y col., 1982), y se las denominó toxinas Shiga (Stx). Por lo tanto, la denominación VTEC o STEC, son equivalentes. Dentro de esta última categoría se encuentra un subgrupo denominado *E. coli* Enterohemorrágico (EHEC). Este descriptor se refiere estrictamente a las cepas que producen colitis hemorrágica (CH) o Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) en seres humanos. Las EHEC además de expresar Stx, poseen muy frecuentemente factores de virulencia adicionales como la isla de patogenicidad LEE (*Locus*

*for Enterocyte Effacement*) y un plásmido de virulencia de que codifica para una enterohemolisina. El prototipo de las EHEC es *E. coli* O157:H7 (Scheutz y Strockbine, 2005). Las cepas EHEC LEE positivas se adhieren íntimamente a las células huésped a través de un mecanismo conocido como “*attachment/effacement*” (A/E), mecanismo que comparten con el patotipo EPEC. Sin embargo, las *E. coli* EPEC sólo producen diarreas acuosa en niños. Por otra parte, existen en menor medida cepas EHEC, productoras de toxina Shiga, LEE negativas, capaces de causar enfermedad (CH ó SUH), en combinación con otros factores de virulencia o colonización. Por eso se utiliza el término STEC para este patotipo, aunque muchos autores utilizan de forma equivalente STEC o EHEC (Naylor y col., 2005).

El patotipo EHEC fue identificado por primera vez como patógeno humano en 1982, cuando el serotipo O157:H7 fue asociado a dos brotes de CH en los estados de Michigan y Oregón (EEUU), causados por el consumo de hamburguesas (Riley y col., 1983). A partir de entonces, la importancia de este grupo bacteriano para la Salud Pública a nivel mundial aumentó, ya que se estima que sólo en Estados Unidos más de 265.000 personas por año sufren una infección originada por STEC, con más de 3.600 hospitalizaciones y producen aproximadamente 30 muertes por año (CDC, 2011). Por lo tanto, los *Escherichia coli* pertenecientes al patotipo EHEC son considerados patógenos emergentes que se transmiten por alimentos y se asocian a brotes y casos de diarrea y CH, siendo el principal agente etiológico del SUH. Si bien, el serotipo O157:H7 es el prevalente, existen otros serotipos de STEC, tales como O26, O103, O111, O145, O45, y O121, entre otros, asociados también a enfermedad severa (Karmali y col., 2003 y CDC, 2011).

En este trabajo nos focalizaremos especialmente en el serotipo O157, tanto del grupo productor de toxina Shiga (STEC O157), como así también en las cepas de este serogrupo que no producen toxina Shiga (*E. coli* O157 Toxina Shiga negativas, EC O157 TSN).

## 1.2. Manifestaciones clínicas de STEC O157

De la población que puede ser afectada por STEC O157, los niños menores de 5 años y los adultos mayores de 65 años, son los individuos que se encuentran en mayor riesgo. La principal manifestación clínica de gravedad es la colitis hemorrágica (CH), la cual se puede complicar con púrpura trombótica trombocitopénica (PTT), sobre todo en adultos y ancianos, o con SUH principalmente en niños menores de 5 años.

La Colitis hemorrágica (CH) tiene un período de incubación de 2 a 10 horas y comienza con fuerte espasmos abdominales seguidos de una diarrea acuosa sin sangre que después de 3 días (rango de 1 a 8 días), y aproximadamente en el 80% de los casos (en Argentina), evoluciona a diarrea sanguinolenta. Puede presentarse o no con náuseas, vómitos, cefaleas y en los casos más graves las heces se presentan como “melenas”, pero no es frecuente la fiebre. Aunque en la mayoría de los casos de CH la evolución es favorable y espontánea, aproximadamente entre un 5-10% de los niños infectados evolucionan a SUH (Rivas y col., 2011).

El SUH es una entidad clínica y anatomopatológica caracterizada por la aparición brusca de anemia hemolítica, trombocitopenia e insuficiencia renal aguda, como consecuencia de una destrucción intravascular de los glóbulos rojos (microangiopatía) de localización predominantemente renal pero que puede afectar también otros parénquimas tales como sistema nervioso central (SNC), intestino, páncreas e hígado. En el riñón se producen lesiones microangiopáticas y trombóticas a nivel glomerular, o necrosis cortical que llevan a una insuficiencia renal aguda. En la mitad de los casos, el trastorno renal es tan severo que puede causar oligo-anuria, requerir diálisis y, sobre todo en niños, el desenlace puede ser fatal. También la microangiopatía puede afectar a otros órganos internos produciendo pancreatitis aguda en el 20% de los casos, afectar el hígado con una marcada hepatomegalia en el 40% de

los casos, en menos del 1% se produce una afección cardíaca. También se puede observar en un 20% de los casos, enfermedad del SNC dando lugar a convulsiones, coma y llevar incluso la muerte. Este síndrome puede tener diversas etiologías, pero el origen más frecuente son las enfermedades infecciosas bacterianas como las producidas por STEC, *Shigella* spp., *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., entre otras bacterias gram-negativas (Karmali y col., 1983). En el caso de SUH posentérico, el mismo está precedido de diarrea, generalmente sanguinolenta que se puede presentar también con fiebre, vómitos y dolor abdominal. En la mayoría de los casos de diarrea por STEC es autolimitada pero se estima que aproximadamente un 5-10% de los pacientes infectados evolucionan a SUH (Rivas y col., 2011). Un tercio de los pacientes infectados con *E. coli* O157:H7 requieren hospitalización. El 75% de los pacientes que sufren SUH requieren transfusiones y el 50%, requieren diálisis por el resto de sus vidas. En los últimos años, el diagnóstico precoz de la enfermedad y el mejor manejo de la insuficiencia renal aguda y de la anemia, disminuyó la letalidad durante el período agudo, siendo en la actualidad del 3 al 5%. Sin embargo, un 5% de niños con SUH desarrolla insuficiencia renal crónica, requiriendo en pocos años procedimientos dialíticos o trasplante renal. Otro 20% continúa con microhematuria y grados variables de proteinuria, pudiendo desarrollar insuficiencia renal crónica terminal (Spizzirri y col., 1997).

La PTT es una afección que se presenta en adultos y afecta sobre todo a ancianos. Se caracteriza por una anemia hemolítica microangiopática (hematocrito <30%), trombocitopenia (<150000 plaquetas/mm<sup>3</sup>) y fiebre, pudiendo llegar a producir trastornos neurológicos e insuficiencia renal aguda. La diarrea prodrómica está generalmente ausente. La duración de la enfermedad puede ser de unas horas o hasta algunas semanas, dependiendo del estado del paciente. Si la enfermedad progresa al SNC y a los riñones, se observan algunos signos neurológicos como modificación en el comportamiento, confusión y delirio que pueden

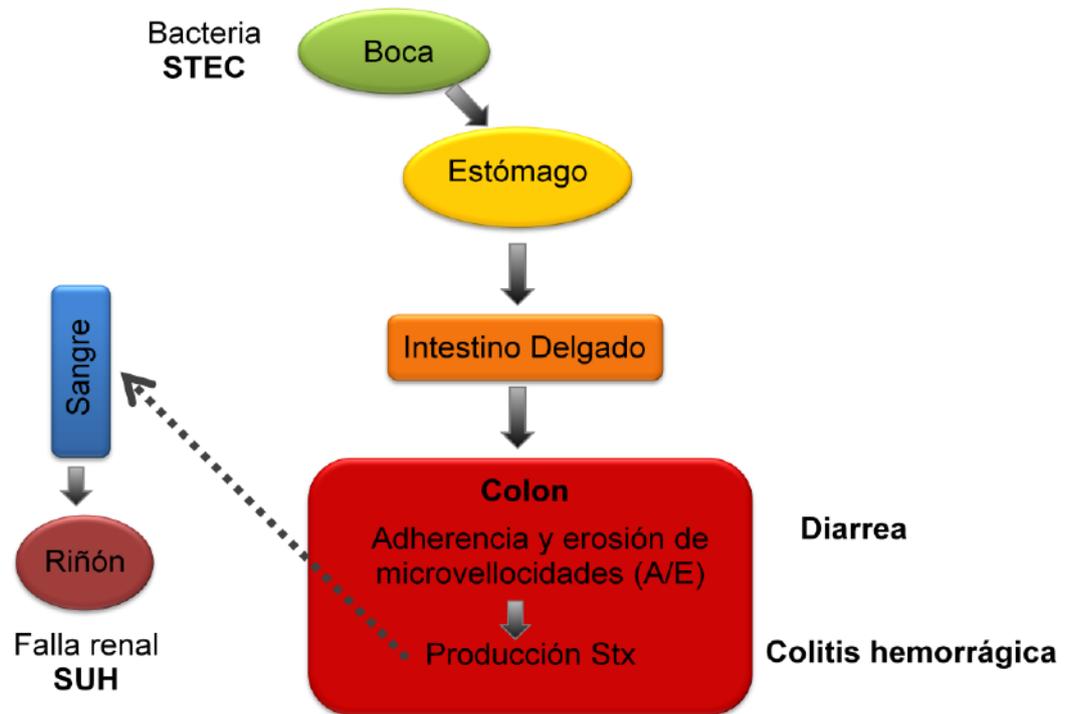
presentarse con crisis de epilepsia, y anomalías en el campo visual, pudiendo terminar en estado de coma y la evolución puede ser fatal (Doyle y col., 1997).

### 1.3. Patogénesis de STEC

La patogénesis de STEC es un proceso de muchos pasos que involucran una compleja interacción entre la bacteria y el huésped. Para que se produzca la infección y la enfermedad, existen etapas esenciales del proceso (Figura 1). Después de la ingestión de las bacterias con el alimento, las mismas deben resistir la acidez estomacal y luego colonizar el tubo digestivo para lo cual las bacterias deben adherirse al epitelio. La acidez del tracto gastrointestinal constituye un importante mecanismo de defensa del hospedador, pero en general se puede decir que STEC tiene una gran resistencia a ambientes ácidos y con presencia de sales biliares, permitiéndole la supervivencia al pH bajo del estómago y al pasaje por el intestino delgado (Large y col., 2005). Una vez en el intestino grueso entran en contacto con los enterocitos a través de las adhesinas fimbriales y se desencadena la expresión de los genes de virulencia para la adherencia a las células epiteliales intestinales. El patrón de adherencia e interacción con las células epiteliales es notablemente diferente entre las cepas LEE-positivas y LEE-negativas. En las cepas LEE-positivas, la adherencia es mediada por una fimbria polar larga (Lpf), seguida por la producción de una histología característica de adhesión bacteriana y erosión o borramiento de las microvelocidades (A/E), que involucra cambios estructurales en las células epiteliales y una adherencia íntima de la bacteria al enterocito. Estas lesiones A/E se limitan a la región del ciego en el colon y se caracterizan por la íntima unión entre la bacteria y la superficie epitelial, y por la pérdida o erosión de las microvellosidades del epitelio intestinal en el sitio de contacto con la bacteria, donde se forma una estructura con forma de pedestal, constituida internamente de actina polimerizada, donde la bacteria parece “asentarse” de forma muy estrecha (Abe y col., 1998; Frankel y col., 2001). Esta lesión

provoca una disminución de la superficie de absorción produciendo probablemente la diarrea acuosa inicial observada en la infección.

**Figura 1:** Proceso de patogénesis de STEC



(Adaptado de Gyles, 2007)

Por el contrario, las cepas LEE-negativas no se presenta la lesión A/E, sino que la adhesión está mediada por otros factores de virulencia (Dytoc y col., 1994). Aunque la lesión A/E no es esencial para la aparición de CH y SUH en humanos, la gran mayoría de las cepas implicadas en estas patologías son STEC LEE-positivas (Paton y col., 1999).

Una vez que se produjo la adherencia, las bacterias liberan toxina Shiga en el lumen del intestino. La adherencia a las células epiteliales induce una respuesta inflamatoria en el hospedador, la cual a su vez facilita el pasaje de la toxina Shiga dentro de la submucosa, y de allí es transportada por el torrente sanguíneo a los órganos blanco (principalmente intestino, riñón, cerebro) donde afecta a las células endoteliales de pequeños vasos sanguíneos ricos en el receptor globotriosilceramida (Gb3). Este receptor es específico para Stx, y una vez unido a

él, ejerce su efecto citotóxico (Paton y Paton, 1998). El daño en los pequeños vasos sanguíneos del colon por las toxinas Shiga parece ser la principal causa de la CH. Igualmente el SUH está asociado a las lesiones glomerulares renales por el daño en las células endoteliales, las cuales se hinchan y se desprenden de la membrana basal, produciendo trombos, estrechamientos u oclusión de la luz capilar, con la consiguiente pérdida de la función renal (Gyles, 2007).

### 1.3.1. Marcadores de virulencia de STEC

Para que ocurra la colonización y la infección por STEC, estas cepas poseen distintos factores de virulencia. Si bien el principal factor de virulencia de STEC es la producción de toxinas Stx, no son las únicas responsables de la patogenicidad bacteriana, se describen además factores de virulencia adicionales, incluyendo adhesinas, proteasas, lipopolisacáridos (LPS), flagelos, sistemas de captura de hierro y otras toxinas (Gyles, 2007; Guth y col., 2011).

#### **Factores de adherencia intestinal:**

Las cepas STEC con capacidad de adherirse al intestino y producir lesiones A/E, comparten esa característica con los EPEC. Las proteínas que participan en esta lesión A/E están codificadas por genes que se encuentran en el locus cromosómico LEE, y entre ellos, los de más importancia para producir la lesión, son el gen *eae* (*E. coli attaching and effacing*), el gen *tir* (*translocated intimine receptor*) y los genes *esp* (*EPEC-secreted protein*) que codifican para un sistema de secreción particular y tres tipos de proteínas.

- El gen *eae* codifica para una proteína de membrana externa denominada **Intimina** cuya función es la adhesión a la célula eucariota. La Intimina se une de forma específica a un receptor llamado **Tir** (Receptor traslocado de Intimina).
- El gen *tir* codifica para el co-receptor específico de la Intimina, **Tir**, que es una proteína que se inyecta en el citoplasma de la célula eucariota a través de un sistema de secreción

formado por las proteínas **Esp** (Proteína de secreción de *Escherichia coli*). Una vez dentro del enterocito, las proteínas **Tir** se insertan en la membrana citoplasmática del mismo para actuar como receptores de la **Intimina** bacteriana. Finalmente cuando el receptor se une a la Intimina, nuclea Actina en el interior de la célula huésped (Kenny y col., 1997).

- Los genes *esp* (*espA*, *espB*, *espD*) codifican para una “jeringa molecular” de proteínas **Esp**, implicada en la traslocación de efectores en la membrana a la célula huésped. Entre los efectores que transfiere se encuentra el receptor **Tir**.
- Sistema de secreción de tipo III está codificado por los genes *sep* (*Secretion E. coli protein*) y *esc* (*E. coli secretion*). El cual es responsable de la secreción de la bacteria de los factores de virulencia como las proteínas **Esp** y **Tir** (De Grado y col., 1999).

El aparato secretor consiste en una estructura molecular tipo aguja que comienza en el interior del citoplasma bacteriano, atraviesa la membrana interna y externa, y pasa a través de la membrana celular del hospedador formando un poro. Las proteínas secretadas son transferidas por esta estructura desde el citoplasma bacteriano hasta la célula huésped, tal como ocurre con la proteína Tir, que una vez que se encuentra en el interior de la célula huésped se inserta en la membrana plasmática exponiendo su región extracelular que funciona como receptor de Intimina (Kaper y col., 2004). Tras la unión de Tir-Intimina, se reclutan, interaccionan y activan otras proteínas reguladoras del citoesqueleto. Todas estas proteínas activadas ocasionan la polimerización de Actina hacia donde se encuentra Tir enclavado. De esta manera, se forman los pedestales principalmente de Actina polimerizada por debajo de donde se encuentra la bacteria adherida. La reorganización del citoesqueleto altera la morfología y fisiología normal de la región apical de las células, lo que lleva a la pérdida de las microvelocidades intestinales y su función. La unión de la bacteria al enterocito produce

un desequilibrio electrolítico, permitiendo el ingreso de iones positivos ( $\text{Na}^+$ ) y la salida de iones cloruros negativos ( $\text{Cl}^-$ ). Asimismo, la destrucción de las microvellocidades ocasiona una disminución en la absorción. Todo lo cual induce a la diarrea acuosa inicial (Vidal y col., 2007). Los mecanismos de activación y regulación de los genes y la traducción de las señales responsables del reordenamiento del citoesqueleto en la célula huésped, aún no son conocidos en detalle.

Aunque se considera que los STEC LEE-positivos son altamente virulentos y están asociados a brotes y casos de enfermedad severa, las cepas LEE-negativas también son capaces de causar enfermedad grave en humanos (Paton y col., 1999), donde participan otros factores de adherencia. Dentro de estos encontramos una Fimbria polar larga, **Lpf** (*Long Polar Fimbria*), la cual se encuentra en dos locus, *lpf1* y *lpf2* que están codificadas en islas genómicas de patogenicidad únicas de O157, denominadas OI-141 y OI-154, respectivamente. Las Lpf además de participar en la adhesión, podrían promover interacciones bacterianas para formar microcolonias (Doughty y col, 2002), también median el tropismo intestinal de STEC O157 (Fitzhenry y col, 2006) y contribuyen a la colonización en animales (Torres y col., 2007). La presencia del factor de *E. coli* enterohemorrágico para la adherencia, **EfaI**, cuyo gen *efal* (*EHEC factor for adherence*) se encuentra tanto en EPEC como en STEC O157, induce una elevada capacidad de adherencia pero no interviene en la lesión A/E (Nicholls y col., 2000). También existe un gen homólogo a *efal*, denominado *toxB* cuya proteína **ToxB** contribuye a la adherencia a células epiteliales intestinales (Tatsuno y col., 2001) y además la proteína **Sfp** (*Sorbitol fermenting plasmid*) (Jenkins y col., 2003), las cuales están codificadas en el megaplásmido de STEC (**pO157**).

Una cepa de STEC no-O157, LEE-negativa y causante de un brote de SUH, exhibió una capacidad de adherencia *in vitro* similar a las STEC LEE-positivas. Estudios posteriores

mostraron la existencia de un megaplásmido que codifica para una proteína denominada **Saa**, Adhesina autoaglutinante de STEC (Paton y col., 1999). La mutagénesis del gen *saa* (*STEC autoagglutinating adhesin*) o la eliminación del megaplásmido, reduce significativamente la capacidad de adherencia de las cepas LEE-negativas (Paton y col., 2001). También se hallaron dos cósmidos que contenían un gen cromosomal que codificaba para una proteína similar a IrgA (*Iron regulated gene A*), y cuyo producto fue denominado **Iha** (Adhesina homologa a IrgA), el cual participa en un patrón de adherencia difuso en cultivos celulares (Tarr y col., 2000).

Tanto cepas patógenas, como comensales necesitan adherirse y colonizar la mucosa intestinal. Las fimbrias son estructuras filamentosas cuya función primaria es la unión a receptores mediante adhesinas localizadas generalmente en los extremos del filamento. La gran mayoría de las cepas de *E. coli* puede expresar la fimbria de tipo 1, la cual interviene en la adherencia manosa-sensible a las células epiteliales de mamíferos, permitiendo la colonización del tracto intestinal (Edwards y Puente, 1998). La expresión de esta fimbria es variable y está asociada a la inversión de un pequeño elemento de ADN, sin embargo parece estar regulada de forma diferente en los serogrupos patógenos (Iida y col., 2001).

Todos los organismos móviles del género poseen flagelos distribuidos al azar en la superficie de las células (perítricos). Los flagelos se encuentran formados por una proteína denominada **Flagelina**, la cual está codificada por el gen *fliC*. Los flagelos de las cepas de *E. coli* O157, en particular el antígeno H7, juega un rol importante en la adherencia y colonización intestinal en bovinos (Erdem y col., 2007), sin embargo no debe ser esencial en la patogénesis en humanos ya que se encontraron cepas no móviles fermentadoras de sorbitol asociadas a muchos casos de SUH en Alemania (Karch y Bielaszewska, 2001).

**Toxina Shiga:**

Las toxinas Shiga (**Stx**) son el principal factor de virulencia y las que definen las características de la enfermedad producida por STEC. Estas fueron reportadas por primera vez por O'Brien y col. (1982). Las Stx están codificadas por los genes *stx* presente en bacteriófagos insertos en el cromosoma bacteriano. Los miembros de la familia Stx poseen una estructura conservada heteropolimérica AB<sub>5</sub>, constituidos por una subunidad A (33 kDa) y por cinco subunidades B (7,5 kDa). La subunidad A es la parte biológicamente activa, tiene actividad N-glicosidasa sobre ARN y actúa específicamente sobre el ARN ribosómico 28S inhibiendo la síntesis proteica y de esta manera se produce la apoptosis celular (Smith y col., 2003). Mientras que la subunidad B es la responsable de la unión al receptor glicolípido específico, Gb3 (O'Brien y Holmes, 1987). Las células endoteliales de la vasculatura del colon, las del parénquima renal y del sistema nervioso central, son particularmente ricas en receptores Gb3, lo cual explica las principales manifestaciones clínicas observadas (insuficiencia renal, trastornos neurológico, diarrea sanguinolenta).

Aunque todas las Stx comparten algunas propiedades como su estructura terciaria de aminoácidos, su disposición genética tipo operón y las propiedades biológicas, como la actividad enzimática y la unión a receptores específicos, la familia de toxina Shiga se pueden clasificar en dos ramas, Stx1 y Stx2, porque el antisuero policlonal producido contra un tipo no neutralizan las toxinas del tipo heterólogo (Scheutz y col., 2001). Cada uno de estos grupos a su vez posee un creciente número de variantes, algunas toxinas difieren en la secuencias y en la actividad biológica de los prototipos de Stx1 y Stx2, y estos subtipos se denotan por letras a continuación del nombre principal. El grupo de las Stx1 tiene una estructura altamente conservada y está compuesto por los subtipos Stx1a, que es idéntica a Stx de *Sh. dysenteriae* tipo 1 (Strockbine y col., 1986); Stx1c (Zhang y col., 2002); y Stx1d (Bürk y col., 2003). A

pesar que Stx1 y Stx2 poseen el mismo mecanismo de acción, estructura y función; comparten sólo un 55% de similitud en la secuencia aminoacídica y cada uno de los subtipos presenta diferencias en su toxicidad en los tejidos celulares y animales, en sus propiedades inmunológicas y en la forma en que atraviesan el epitelio intestinal (Schmidt y col., 2000). El grupo de las Stx2 es más heterogéneo, y comprende a los subtipos Stx2a (O'Brien y col., 1984), Stx2b (Melton-Celsa y col., 1996; Pièrard y col., 1998), Stx2c (Schmitt y col., 1991), Stx2d (Kokai-Kun y col., 2000), Stx2e (Weinstein y col., 1988), Stx2f (Schmidt y col., 2000) y Stx2g (Leung y col., 2003). La falta de directrices uniforme para la definición y denominación de los subtipos y la gran diversidad de secuencias, ha generado mucha confusión por lo que se ha recomendado que los miembros de la familia de toxina Shiga se clasifiquen en función de las diferencias fenotípicas, actividad biológica y propiedades de hibridación. Algunos subtipos son clínicamente relevantes, las variantes de Stx2 parecen estar altamente asociadas a secuelas graves como el SUH. Otros subtipos de Stx1 se asocian con enfermedad de curso más leve, mientras que se encontraron subtipos de Stx en algunas cepas de STEC que probablemente no son patógenas para humanos (Scheutz y col., 2001). De todas las variantes de toxina Shiga reportadas hasta el momento, las asociadas a enfermedad humana son la Stx1 (casi idéntica a la Stx producida por *Sh. dysenteriae* serotipo 1), Stx1c (variante asociada a humanos con diarrea leve o ningún síntoma) y las variantes Stx2 (Prototipo de Stx asociada con enfermedad grave en el hombre), Stx2c (asociada con diarrea y SUH en seres humanos), Stx2d (asociada con STEC *eae*-negativa y enfermedad leve en seres humanos), Stx2d-activable (Citotoxicidad en células Vero se aumenta de 10 a 1000 veces por la elastasa del moco intestinal de ratón, las cepas con esta toxina son altamente virulentas). La variante Stx2e es responsable de la enfermedad de edema en cerdos y muy rara en la enfermedad humana y Stx2f es una variante aislada de excremento de paloma y no asociada a

enfermedad humana (Gyles, 2007). Por lo tanto, la caracterización del subtipo de toxina posee un importante valor predictivo de la evolución a SUH de los pacientes infectados con STEC (Friedrich y col., 2002).

Las estrategias de subtipificación de las variantes de las toxinas son esenciales para la vigilancia y para predecir los riesgos asociados con infecciones particulares con STEC. Estas diferencias derivan de variaciones en secuencias nucleotídicas por lo que las variantes se establecen según la neutralización del efecto citotóxico en células Vero o Hela con anticuerpos específicos, y por la detección de los genes *stx* por técnicas tales como el análisis de polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (Scheutz y col., 2001; Gannon y col., 1990; Ito y col., 1990; Tyler y col., 1991; Calderwood y col., 1996; Bertin y col., 2001).

#### **Plásmido pO157:**

La mayoría de las cepas STEC O157:H7 presentan un megaplásmido de 90 Kb que contiene diversos genes u operones que codifican para diferentes factores de virulencia: *ehxA*, *etpC-O*, *toxB*, *espP*, *kat*, *stcE* y *ecf* (Law, 2000; Schmidt y col., 1995). Su presencia es necesaria para que los EHEC expresen su virulencia completa.

- **Enterohemolisina** (EHEC-Hly): Algunos serotipos de STEC tienen un fenotipo hemolítico y sus cultivos pueden lisar eritrocitos por su capacidad de formación de poros (Cavalieri y col., 1984). Por lo tanto, se rompe el equilibrio osmótico de las células atacadas, las cuales se lisan. Esto permite a las bacterias extraer hierro de los glóbulos rojos liberados al intestino (Beutin y col., 1989). La proteína está codificada por el gen *ehxA* dentro de un operón formado por otros genes *ehx* implicados en la síntesis y secreción de la enterohemolisina.

- **Serina proteasa extracelular:** Los genes *espP* codifican una serina extracelular y un sistema de autotransporte EspP, la cual inhibe el factor cinco de coagulación favoreciendo el

sangrado. Parecen tener efecto sinérgico con la enterohemolisina durante el desarrollo de la enfermedad hemorrágica.

- **Catalasa-peroxidasa:** codificada por el gen *katP*
- Sistema de secreción tipo II: diversos genes *etp*, desde el C al O, están implicados en la vía de secreción tipo II.

También contiene al operón *ecf* que codifica enzimas modificadoras de la estructura de los lipopolisacáridos y a un inhibidor de estearasa C1, *stcE*.

#### **Otros factores de virulencia:**

En algunos serotipos de STEC no-O157 se identificaron plásmidos de secuencia similar al pO157. El megaplásmido pO113 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, más específicamente con el serotipo O113:H12. El gen *lpf* asociado a una Fimbria polar larga que incrementa la adherencia, la habilidad de colonización y la persistencia de la infección de STEC O157 (Paton y col, 2001).

Si bien los aislamientos de STEC difieren en su virulencia, la incidencia y la severidad de las infecciones, no pueden atribuirse únicamente a los factores de virulencia, sino que son el resultado de la interacción del patógeno con factores del huésped y del ambiente.

#### 1.4. Resistencia y adaptación al estrés

La palabra “estrés” en el campo de la biología se refiere a la exposición a condiciones nutricionales mínimas, a condiciones químicamente tóxicas o a condiciones físicas subóptimas (Yousef y Courtney, 2003). En este trabajo, nos referiremos a estrés como algún factor deletéreo o alguna condición adversa que afecte el crecimiento o supervivencia de los microorganismos. Entonces, de acuerdo con esta definición, las bacterias presentes en los alimentos pueden estar expuestas a diferentes estreses a lo largo de toda la cadena alimenticia,

desde la producción de un alimento hasta su consumo. Algunos ejemplos de los tipos de estrés que pueden sufrir los microorganismos son la aplicación de procesos de refrigeración o térmicos, la acidificación, la desecación, o el uso de atmósferas modificadas, entre otros. Estas condiciones pueden provocar el daño subletal (injuria) o la muerte de las bacterias. Sin embargo, algunas bacterias pueden poseer una tolerancia natural a ciertos factores de estrés, es decir pueden ser naturalmente más “tolerantes” o “resistentes” a un factor deletéreo en particular (por ejemplo pH bajo) y sobrevivir en esa condición debido a su constitución genética. Por otro lado, los factores de estrés pueden inducir cambios fisiológicos en algunos microorganismos, incluyendo alteraciones del metabolismo y cambios estructurales, que ayudan a las bacterias a adaptarse al nuevo ambiente. Estos poseen lo que se denomina “respuesta adaptativa al estrés o adaptación” y les confiere habilidad para sobrevivir a condiciones extremas. Por otra parte, el estrés inducido por factores fisicoquímicos puede incrementar la virulencia en las células adaptadas (McClure, 2005). Una característica importante de la respuesta adaptativa es la protección cruzada ya que la adaptación a un estrés puede inducir una respuesta generalizada en la célula que protege tanto contra el factor inductor como contra otros tipos de estrés (Cheville y col., 1996).

Existe un mecanismo regulatorio común involucrado en general en todas las respuestas al estrés y que también está involucrado en la regulación de la fase estacionaria de crecimiento donde las bacterias tienen que adaptarse a condiciones adversas para seguir creciendo. En este mecanismo está involucrado un factor sigma alternativo (proteína RpoS). El factor sigma es la sexta subunidad de la ARN polimerasa y su función es reconocer y unirse a promotores específicos en la secuencia de ADN y proveer el alineamiento apropiado para la polimerasa. Las bacterias codifican diferentes factores sigmas intercambiables y el principal es el factor sigma 70 ( $\sigma^{70}$ ) que es responsable del reconocimiento de la mayoría de los promotores (factor

housekeeping), pero también existe el factor sigma “s” sustituto o alternativo ( $\sigma^S$ ) que tiene especificidad para diferentes promotores que dirigen la expresión de un regulón (gran número de genes coordinadamente controlados) especialmente involucrado en los cambios fisiológico de la fase estacionaria y en la regulación y expresión de muchas proteínas que participan en la respuesta general al estrés (Hengge-Aronis, 2000; Loewen y col., 1998). Los cambios que induce el factor sigma en las células para mantener su viabilidad durante la fase estacionaria, a su vez aumentan la resistencia en general a diferentes obstáculos ambientales. RpoS controla la expresión de más de 50 genes en *E. coli* involucrados en la respuesta al estrés térmico, al estrés osmótico, oxidativo, a la falta de nutriente, al ambiente ácido, a la luz UV y al etanol (Cheville y col, 1996). Sin embargo, una red compleja de reguladores adicionales, dependiendo del tipo de estrés, se activan y llevan a la expresión de otros genes y a variaciones en el estado de la resistencia al estrés (Waterman y Small, 1996).

#### *Escherichia coli* O157 y el estrés ácido

Una propiedad importante de los organismos patógenos asociados a enfermedades transmitidas por alimentos (ETA), es su capacidad para sobrevivir en ambientes extremadamente ácidos tales como el ambiente gástrico (normalmente alrededor de pH 1-2), primera línea de defensa contra las ETA. Esta capacidad les permite también resistir entornos de acidez, la supervivencia, e inclusive el desarrollo, en determinados alimentos de acidez moderada que normalmente inactivarían a otras bacterias patógenas. Por lo tanto, la Resistencia Ácida (RA) es una característica importante de los patógenos gastrointestinales (Lin y col., 1996). La resistencia al estrés ácido es un fenómeno complejo que varía según las especies bacterianas y es dependiente de la fase de crecimiento en que se encuentren, como así también del tipo de ácido con el que se disminuya el pH y de la forma de exposición (Buchanan y Edelson, 1999; Ryu y col., 1998).

*E. coli* es una bacteria muy versátil que se ha adaptado a una variedad de condiciones ecológicas adversas tanto en animales hospedadores como en el medio ambiente externo. Tanto cepas patógenas como comensales tienen capacidad para sobrevivir a condiciones ácidas; sin embargo, se demostró que las EHEC son sustancialmente más resistentes a condiciones ácidas y a otros tipos de estrés que las cepas no patogénicas (Benjamín y Datta, 1995) y particularmente las cepas de *E. coli* del serotipo O157:H7 tiene una capacidad superior para sobrevivir en ambientes ácidos similares a las condiciones gástricas, en comparación con otros serotipos no-O157 (Bergholz y Whittam., 2007).

Por otro lado, se han reportado varios brotes de enfermedad producida por el serotipo patógeno O157:H7, donde estuvieron implicados alimentos ácidos tales como mayonesa, yogurt, jugo de manzana sin pasteurizar, salame y salchicha fermentada, entre otros (Steele y col., 1982; Griffin y Tauxe, 1991; Besser y col., 1993; Morgan y col., 1993). Se considera que este patógeno de alimentos, debido a su capacidad para sobrevivir en alimentos ácidos y su baja dosis infectiva, ha desarrollado múltiples mecanismos para sobrevivir en pH extremadamente bajo, volviéndose altamente resistente a estrés ácido en comparación con otras bacterias patógenas, tales como *Salmonella*, *Shigella* o *Listeria* (Gorden y Small, 1993; Arnold y Kaspar, 1995; Buchanan y Edelson, 1996 y 1999; Roering y col., 1999). Estas características, estimularon el interés de algunos autores en la determinación de dichos mecanismos implicados en la RA de *E. coli* O157:H7 (Benjamin y Datta, 1995; Large y col., 2005; Leyer y col., 1995; Lin y col., 1996; Waterman y Small, 1996).

Cuando una bacteria se encuentra en un ambiente ácido, ya sea por el efecto de un ácido inorgánico o por la presencia de ácidos orgánicos débiles, debe enfrentarse con diferentes problemas, uno de los principales es mantener la fuerza protomotriz a nivel de la membrana plasmática, la cual es una forma importante de energía disponible para las funciones celulares.

Entonces, la afluencia de protones y aniones puede perturbar la estabilidad de su condición interna y producir la disminución del pH interno de la bacteria, el cual a su vez puede producir la pérdida de función o desnaturalización de proteínas y enzimas. La desnaturalización enzimática deriva en que muchos procesos fisiológicos no pueden producirse. Así mismo, el exceso de ácido puede producir daños a nivel de ADN y de membrana.

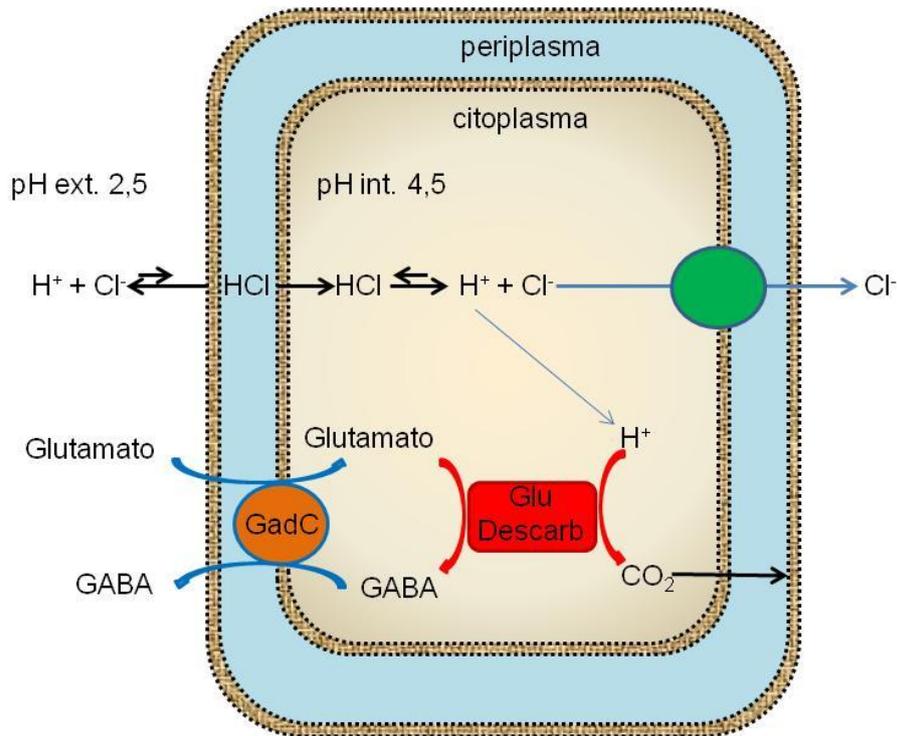
Para prevenir el decrecimiento del pH dentro de la célula, *E. coli* posee varios mecanismos para mantener el pH interno, de ser necesario, hasta dos unidades más alto que el pH externo. Varios autores reportaron que tras la entrada de *E. coli* en fase estacionaria, las células se vuelven más ácido resistentes mediante al menos 3 sistemas de RA, genética y fisiológicamente distintos que se activan en ese momento. Brevemente, el mecanismo de resistencia ácida 1 (RA1), también denominado sistema oxidativo, es un mecanismo de fase estacionaria, inducido por ácido, reprimido por glucosa y que requiere la presencia de un factor sigma alternativo RpoS para poder expresarse. El sistema RA2 o Glutamato dependiente, también es inducido fisiológicamente en fase estacionaria pero requiere la expresión de una glutamato descarboxilasa, un glutamato putativo y Glutamato exógeno para funcionar en condiciones extremadamente ácidas. El sistema RA3 es Arginina dependiente, requiere la presencia de una arginina descarboxilasa ácido inducible y funciona sólo en presencia de Arginina extracelular (Richard y Foster, 2003).

Estos tres sistemas de RA inducidos en fase estacionaria son los principales mecanismos de la resistencia ácida de *E. coli* y en los cuales nos enfocaremos en la tercera parte del presente trabajo, pero además se conocen otros dos sistemas de RA a base de enzimas descarboxilasa; el sistema Lisina descarboxilasa dependiente (RA4) y el Ornitina descarboxilasa dependiente (RA5), que requieren la presencia del aminoácido específico, Lisina y Ornitina

respectivamente, y del antiporte que intercambia el producto descarboxilado por un nuevo sustrato. Los sistemas Glutamato y Arginina dependientes (RA2 y 3, respectivamente) permiten a la bacteria sobrevivir a condiciones extremadamente ácidas (aproximadamente pH 2,5), mientras que los sistemas Lisina y Ornitina dependientes, trabajan en un pH ácido externo moderado (pH aproximado 4,5) (Peng y col., 2011). El modo de acción de los cuatro sistemas de resistencia ácida basados en descarboxilasas es reemplazar el grupo  $\alpha$ -carboxilo del aminoácido sustrato con un protón del citoplasma, así un protón es consumido y una molécula de dióxido de carbono es generada junto con el producto amino final. Estos productos son transportados fuera de la célula por los antiportes específicos que ingresan simultáneamente el sustrato correspondiente. El consumo de protones disminuye la cantidad de protones libres en el citoplasma, aumentando así el pH interno (Figura 2). Las vías de regulación de estos sistemas no son aún bien conocidas, pero el principal factor para su activación es el descenso de pH (Peng y col., 2011).

Además, se conoce que si el pH externo se disminuye utilizando ácidos orgánicos o débiles, estos son más efectivos para inhibir el crecimiento bacteriano que los ácidos inorgánicos. Esto se debe a que a pH bajo los ácidos orgánicos penetran la membrana plasmática en su forma no disociada ( $\text{pH externo} < \text{pKa del ácido en cuestión}$ ) y luego dentro del citoplasma, con un pH interno cercano a la neutralidad ( $\text{pH interior} > \text{pKa}$ ), se disocian y liberan protones ( $\text{H}^+$ ), entonces se acumula tanto el catión como el anión y de esta manera se disminuye rápidamente el pH interno (Forsythe, 2000).

**Figura 2:** Modo de acción de los sistemas de RA basados en la descarboxilación de aminoácidos



GadC: antiporte putativo de glutamato-GABA

Glu Descarb: Glutamato descarboxilasa

(Adaptado de: Forsythe (2000) y, Richard y Foster (2003))

La respuesta al estrés ácido por el mecanismo RA1 es el menos comprendido pero se conoce que la activación de este sistema ocurre cuando las células son cultivadas hasta fase estacionaria en un medio complejo (Luria Bertani, LB) de acidez moderada (pH 5,5), en ausencia de glucosa. Cultivada en esas condiciones, las bacterias luego son capaces de sobrevivir bien a un desafío a pH 2,5 en un medio mínimo y sin suministro de aminoácidos exógenos. Este mecanismo se encuentra regulado por el factor sigma RpoS, y además por AMPc y la proteína receptora de AMPc (CRP). Debido a esto, el sistema RA1 es reprimido por glucosa, como también se lo denomina (Castanie-Cornet y col., 1999).

El sistema RA2 es el más estudiado de los mecanismos de resistencia ácida. La activación de este sistema ocurre cuando las células son cultivadas hasta fase estacionaria en un medio de cultivo complejo (LB) conteniendo glucosa. De esta manera, la glucosa reprime el sistema

RA1 y permite estudiar RA2. En estas condiciones las células sobreviven a un desafío de pH 2 en medio mínimo con Glutamato. La Glutamato descarboxilasa cataliza la conversión del Glutamato en ácido gamma-amino butírico (GABA) y en el proceso se consume un protón ( $H^+$ ) y se libera dióxido de carbono ( $CO_2$ ). El GABA producido por descarboxilación es transportado fuera de la célula por un antiporte putativo (GadC), con el concomitante ingreso de Glutamato exógeno. Este antiporte es electrogénico en condiciones de pH ácido (Figura 2) (Richard y Foster, 2003).

El sistema de resistencia ácida 3 es Arginina dependiente y sus componentes estructurales son similares a los del sistema RA2; requiere Arginina descarboxilasa y se también se ha identificado un antiporte Arginina-Agmatina. Este antiporte también es electrogénico ya que a pH 2,5 externo, Arginina tiene una carga neta +1, mientras que Agmatina sale con una carga +2 y de esta manera contribuyen a la fuerza protomotriz (Igual en RA2).

Además de los sistemas de Resistencia Ácida, también han sido reportados otros sistemas de “tolerancia ácida” o “adaptación” menos eficaces. La respuesta de Tolerancia Ácida (TA) inducida ha sido reportada por varios autores en diferentes microorganismos entéricos tales como *Salmonella*, *Shigella* y *E. coli* (Buchanan y Edelson, 1996; Gordon y Small, 1993; Samelis y col., 2003). Se demostró que la exposición de estas bacterias a pH subletales (4,5-5,5) permite la adaptación o habituación de estos microorganismos a condiciones ácidas, de manera tal que se induce en ellos una TA que los protege de desafíos a pH tan bajos como 2,5-3,7 por determinados períodos de tiempo. Las cepas de EHEC tienen un alto grado de tolerancia ácida y pueden sobrevivir hasta 7 horas a una exposición a pH 2,5 ó 3 a 37°C, luego de crecer en condiciones de acidez moderada (Benjamin y Datta, 1995; Buchanan y Edelson, 1996; Del Castillo y col., 2004). Uno de los mecanismos de protección es por una disminución de la permeabilidad de la membrana a los protones a través de la producción de

ácidos grasos de cadena corta (Richard y Foster, 2003). La TA es un fenómeno complejo que puede inducirse tanto en fase estacionaria como en fase exponencial de crecimiento y varía ampliamente según las especies bacterianas o entre cepas de una misma especie y también en relación al tipo de acidulante usado en el desafío (Samelis y col., 2003). Richard y Foster (2003) distinguen la respuesta de ácido tolerancia producida en fase logarítmica de crecimiento de los sistemas de resistencia ácida de fase estacionaria, donde la diferencia más importante radica en que la TA de fase logarítmica, no protege a las células a desafíos por debajo de pH 3, la protección es efectiva en un plazo de tiempo más breve y no requiere de la presencia de aminoácidos exógenos como sucede en los sistemas RA. Por otra parte, las células en fase estacionaria son 1000 a 10000 veces más resistentes a ácido que los organismos creciendo en fase exponencial y también pueden exhibir la TA ácido inducible que además incrementa la RA ácido independiente (Samelis y col., 2003; Waterman y Small, 1996).

Los microorganismos que producen ácido como consecuencia del metabolismo de carbohidratos, experimentan una gradual disminución del pH en el medio. Esta acidificación induce una tolerancia ácida durante la fase estacionaria que permite desarrollar una tolerancia a pH ácidos como así también a otros factores deletéreos tales como osmolaridad alta y/o temperaturas sub-óptimas, luz UV, estrés oxidativo, etc. Es decir que la TA induce en los microorganismos una protección cruzada contra diferentes factores de estrés que debe ser considerado en el procesamiento de alimentos (Leyer y col., 1995; Cheville y col., 1996). En especial porque puede contribuir a su potencial patogénico permitiendo que algunas de sus células resistan el ambiente ácido del estómago, resultando patogénicas en bajas dosis infectivas (Doyle y col., 1997). Esta inducción de TA también podría producirse en alimentos ligeramente ácidos tales como carne, quesos y otros alimentos fermentados, en condiciones

normales de producción, si se encuentran contaminados con bacterias como EHEC, y aumentar el riesgo de infección (Miller y Kaspar, 1994; Riordan y col., 2000; Peng y col., 2011; Zhao y Doyle, 1994).

Como se detallará posteriormente, *E. coli* EHEC, especialmente el serotipo O157:H7, se encuentran almacenados en el intestino grueso principalmente de ganado bovino. Dentro del tracto intestinal de los animales, las bacterias pueden encontrarse en fase estacionaria y estar expuestas a ácidos grasos de cadena corta, dos condiciones que pueden inducir los sistemas de resistencia ácida (Lin y col., 1996; Saridakis y col., 2004). Estos sistemas permanecerán activos hasta que las células vuelvan a entrar en fase de crecimiento. Si esos organismos eliminados por materia fecal contaminan un alimento que se conserva refrigerado, los mecanismos de RA permanecen activos por al menos un mes (Lin y col., 1996; Price y col., 2004). Por lo tanto, estos patógenos estarán preparados para resistir el pasaje por el estómago humano, y además el alimento ingerido con ellos, puede proporcionar niveles suficientes de Glutamato o de Arginina para el funcionamiento de los sistemas de RA.

Por otra parte, los sistemas de RA1 y 2 también contribuyen a la supervivencia de los organismos dentro del tracto gastrointestinal del reservorio bovino, mientras que RA3 no se ha encontrado que colabore en este nivel (Price y col., 2004; Richard y Foster, 2003). Algunos estudios sugieren que la dieta de los animales también influye en la respuesta al estrés ácido de las EHEC, ya que algunos alimentos disminuyen el pH en el colon de los animales (Diez-González y col., 1998).

Como se comentó más arriba, la mayoría de los brotes descritos de EHEC son producidos por carne contaminada. En la industria cárnica es muy común el uso de ácidos orgánicos, tales como ácido láctico o acético, para reducir la contaminación microbiana de las carcasas. El alto nivel de RA de cepas de EHEC encontrado en algunos estudios (Benjamin y

Datta, 1995), pone en duda la eficacia del lavado con ácidos orgánicos y su efecto bactericida sobre *E. coli* O157:H7 en particular. La adaptación a condiciones ácidas en el tracto gastrointestinal bovino posiblemente induzca a una mayor resistencia microbiana en la decontaminación con ácido de las canales (Berry y Cutter, 2000). Estos estudios subrayan también la importancia de la resistencia ácida de *E. coli* en la patogénesis humana.

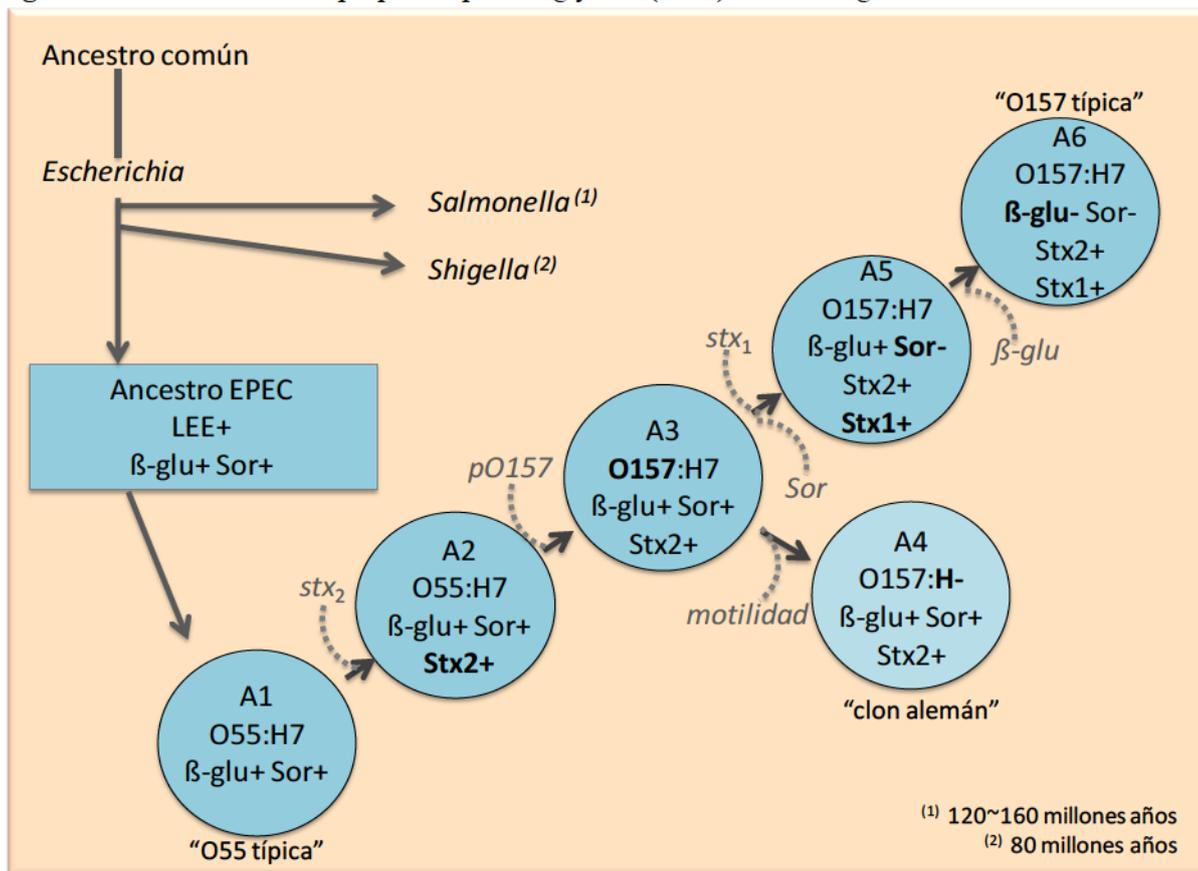
### 1.5. Evolución de la *Escherichia coli* O157:H7

Estudios filogenéticos muestran que las bacterias entéricas partieron de un ancestro común e indican que *Salmonella* spp y *Escherichia* spp se diferenciaron hace aproximadamente 120-160 millones de años, coincidiendo con la aparición de los mamíferos. Sin embargo *Shigella* spp se diferenció de *E. coli* hace 80 millones de años, coincidiendo con la evolución de los primates. Luego la inserción de la isla de patogenicidad LEE en el cromosoma de *E. coli* comensal dio lugar a la aparición de *E. coli* enteropatógeno (EPEC), fermentador de sorbitol (Sor (+)) y con actividad  $\beta$ -glucuronidasa ( $\beta$ -glu (+)). En el modelo evolutivo de Feng y col. (1998), se hipotetizó que el grupo O157:H7 se desarrolló a través de una serie de etapas a partir de este antecesor tipo EPEC, no toxigénico (Figura 3). El modelo predice que el antecesor común más reciente de la cepa O157:H7 y de la O55:H7 (A1) (Wick y col., 2005), contenía el LEE y podía provocar diarrea a través de un mecanismo A/E. Luego A1 adquirió el gen de la toxina Stx2, a través de un proceso de transducción, lo que resultó en un O55:H7 Stx2+ (A2). En la siguiente etapa se adquirió el gran plásmido de virulencia pO157 y entonces el antígeno somático O55 cambió a O157 (A3) y también junto con el plásmido se adquirieron otros factores de virulencia tal como el gen de la hemolisina (*ehxA*). A partir de esa etapa, dos líneas separadas evolucionaron, una rama perdió la motilidad por mutación en el operón flagelar, resultando en O157 Sor (+) (también llamadas fermentadoras de sorbitol, FS O157). Este clon fue descubierto en Alemania en algunos casos

de SUH y por eso también se lo denomina clon alemán (A4). El primer hallazgo de este clon se produjo en 1988, durante un brote de SUH (Karch y col., 1993) y se caracterizó por diferir en los 3 rasgos más importantes del serotipo O157:H7: fermentaban sorbitol, producían  $\beta$ -glucuronidasa y no eran móviles. La otra rama, de donde descienden las cepas O157  $\beta$ -glu (+), perdieron la capacidad de fermentar sorbitol y ganaron el gen de la toxina Shiga 1 (A5). Posteriormente, una inactivación mutacional del gen *uidA*, resultó en la pérdida de la actividad  $\beta$ -glucuronidasa, transformándose finalmente en el fenotipo Sor (-) y  $\beta$ -glu (-), típico de *E. coli* O157:H7 (A6). Los descendientes clonales de A6 fueron los que se expandieron y extendieron geográficamente y por ello ahora representan la mayoría de las cepas de EHEC O157. Estas cepas pueden perder los genes de Stx o de movilidad en la naturaleza o durante el aislamiento y cultivo, lo que explica las variantes se pueden encontrar (Feng y col., 1998).

Por otro lado, en Alemania en la última década se han encontrado cepas de *E. coli* O157:H7/H<sup>r</sup>, fermentadoras y no fermentadoras de Sorbitol (FS y nFS) aisladas de pacientes con SUH y diarrea con sangre, que son toxina Shiga negativas y se ha probado que estas cepas han perdido los genes *stx* durante la infección (Bielaszewska y col., 2007; Friedrich y col., 2007) y otras cepas fueron inherentemente *stx*-negativas, FS, asociadas a casos y brotes de diarrea no sanguinolenta (Friedrich y col., 2007).

**Figura 3:** Modelo evolutivo propuesto por Feng y col. (1998) en la emergencia de *E. coli* O157:H7



(Adaptado de Wick y col., 2005)

### 1.6. Herramientas epidemiológicas actuales

La vigilancia de las infecciones bacterianas es un componente fundamental de la Salud Pública ya que con la continua y sistemática colección, análisis e interpretación de datos se pueden monitorear la tendencia de las enfermedades, estimar la magnitud de problema de salud y realizar evaluaciones de riesgo, detectar brotes de enfermedades, evaluar programas de intervención e identificar las necesidades de investigación. Toda esta información ayuda a identificar e implementar políticas de Salud. Dentro de la vigilancia de las enfermedades transmitidas por alimentos es muy importante el rol del laboratorio ya que muchos patógenos presentan manifestaciones clínicas similares y el laboratorio ayuda a conocer la etiología, diseminación, distribución y reservorio de los microorganismos. Para obtener esta

información es necesario no sólo aislar el germen en cuestión, sino también caracterizarlo y compararlo con otros relacionados.

Algunos métodos primarios de tipificación están basados en las características fenotípicas bacterianas, como características morfológicas, de coloración, crecimiento y diferenciación en medios selectivos. También dentro de la caracterización fenotípica se pueden explorar las propiedades bioquímicas y fisiológicas expresadas por los microorganismos, entre las que se incluyen la determinación de biotipos, perfil de resistencia a antibióticos, serotipos, perfiles electroforéticos y producción de enzimas o toxinas, entre otros.

Puesto que *E. coli* es una bacteria comensal del intestino grueso humano, el aislamiento y diferenciación de las cepas patógenas de esta especie se constituye en un problema fundamental en el análisis. Afortunadamente, en el caso de STEC O157, algunas de sus características bioquímicas resultan claves para su diferenciación ya que, contrariamente a lo que ocurre con la mayor parte de las cepas de *E. coli*, las del serotipo O157:H7 en general no fermentan sorbitol, no tienen  $\beta$ -glucuronidasa, y crecen a 42°C. Por ello inicialmente se modificó el agar MacConkey, sustituyendo la lactosa por el sorbitol como carbohidrato fermentecible, en el medio de cultivo diferencial para *E. coli* O157. Además, en el paso de aislamiento, la técnica de separación inmunomagnética, basada en el antígeno superficial O157, se utiliza en todo el mundo con un significativo aumento en la recuperación de *E. coli* O157:H7 (Forsythe, 2000).

Los métodos de subtipificación son esenciales en estudios de vigilancia y epidemiología de investigaciones, en particular en casos de brotes. Existen varios métodos que se pueden utilizar para demostrar si aislamientos individuales pueden, o no, estar epidemiológicamente relacionados. En la actualidad, se utilizan además métodos de subtipificación molecular que permiten identificar clones bacterianos. Estos métodos presentan mayor poder discriminatorio

y reproductibilidad que las técnicas fenotípicas. Durante las últimas décadas, se han desarrollado métodos genotípicos, mayormente basados en PCR, que analizan características mucho más estables que las fenotípicas y que pueden ser más discriminatorias ya que el genoma de cada cepa es único. Para la subtipificación de STEC se investiga muy frecuentemente el análisis de los genes de virulencia tales como las variantes de los genes de las toxinas (*stx*), del gen de adhesión (*eae*) o de la hemolisina (*ehxA*) (Gyles, 2007).

Unas de las principales técnicas moleculares utilizadas para subtipificar *E. coli* es la electroforesis de campos pulsados (PFGE: *Pulsed-Field Gel Electrophoresis*), que permite observar el polimorfismo genético existente en una población bacteriana mediante el análisis de los patrones de restricción del ADN cromosómico (Strockbine y col., 1998). Esta metodología se basa en la utilización de enzimas de restricción de corte poco frecuente (macrorrestricción), que generan de diez a veinte fragmentos grandes (40 a 500 kb) del ADN, los cuáles son luego separados por la aplicación de campos eléctricos alternados durante la electroforesis en gel de agarosa (PFGE). La comparación de los patrones de fragmentos de ADN obtenidos permite determinar las relaciones entre los aislamientos, y juega un papel importante en la identificación de las fuentes de infección mediante la comparación de los aislados de alimentos o animales con los de pacientes, de manera de detectar brotes o casos esporádicos de infección.

El PFGE se considera el método de subtipificación *Gold Standard* para *E. coli* O157 (O'Sullivan y col., 2006), y es la técnica estandarizada utilizada en la Red Internacional de vigilancia epidemiológica de ETA, denominada *PulseNet* (Gyles, 2007). Cada patrón de PFGE, ya sean únicos por aislamiento o el mismo patrón para un grupo de cepas (*clusters*), recibe un código identificador unívoco y universal dentro de la red PulseNet, definidos por 12 caracteres de la siguiente forma: ZZXXXYYY.0000, donde los 2 primeros caracteres

representan el país donde fue hallado, los 3 segundos al patógeno, los 3 siguientes referencian la enzima de restricción utilizada y los últimos 4 son caracteres numéricos que designan el número de patrón de PFGE, los cuales se asignan secuencialmente a los nuevos patrones encontrados (Swaminathan y col., 2006).

En nuestro país, el Servicio de Fisiopatogenia del Departamento de Bacteriología, del INEI-ANLIS “Dr. C. G. Malbrán”, es el laboratorio de Referencia Nacional de vigilancia epidemiológica de SUH, diarreas por STEC y *E. coli* diarragénicos, y participa en la base de Datos de la red regional PulseNet de América Latina y Caribe. En este Servicio, se realizó la subtipificación de los aislamientos obtenidos en este trabajo de Tesis.

### 1.7. Ecología de *E. coli* O157

#### 1.7.1. Reservorio y vías de transmisión de *E. coli* O157

Aunque la mayoría de los animales pueden ser portadores asintomáticos de STEC, es reconocido internacionalmente que el tracto intestinal bovino es el principal reservorio de este grupo patogénico y que estaría involucrado también en la diseminación de las mismas (Doyle y col., 1997). Algunos hechos conocidos del ganado como reservorio de STEC son: a) la bacteria no es patógena para el ganado, con excepción de casos en neonatos bovinos (Dean-Nystrom y col., 1997), b) la colonización es transitoria, de menos de 2 meses de duración, c) la portación fecal es más frecuente en el ganado joven (2 a 24 meses) que en el ganado adulto, d) los animales engordados en sistemas de cría intensiva, alimentados o suplementados con granos, tienen una prevalencia superior a la observada en animales de sistemas de pastoreo, probablemente esto se deba a alteraciones de la flora normal, el pH y la concentración de ácidos grasos en el tracto digestivo de los animales, sin embargo la evidencia científica no es concluyente al respecto (Hovde y col., 1999).

Históricamente, las vías de transmisión de STEC (O157 y otros serotipos) son los alimentos contaminados, principalmente se han vinculado con carne molida o productos cárnicos crudos o insuficientemente cocidos, hamburguesas en particular (Doyle y col., 1997). Sin embargo, más recientemente este patrón ha variado con un mayor número de productos alimenticios tales como embutidos fermentados, morcilla, leche no pasteurizada o hervida, yogur, quesos, papas, lechuga, brotes de soja y alfalfa, jugos de manzana no pasteurizados, y agua (Karper y col., 2004; Caprioli y col., 2005). También se reportaron brotes por vegetales en ensaladas y por espinacas (Erickson y Doyle, 2007). La contaminación de estos alimentos se debe principalmente a que durante la producción primaria estuvieron en contacto con heces de ganado bovino, con aguas contaminadas, o por contaminación cruzada durante la preparación de los alimentos. Además, otro modo de transmisión es el contacto directo del hombre con los animales y la transmisión que se produce de persona a persona siguiendo la vía fecal-oral ya que este microorganismo puede eliminarse con las heces de una persona infectada durante unos 20 días en promedio, siendo esta la razón de los casos humanos secundarios. También se han visto caso de contaminación por aguas de recreación (Figura 4) (Doyle y col., 1997 y Gyles, 2007).



## 1.8. El SUH y la cadena de la carne en la Argentina

### 1.8.1. Situación actual del SUH

En la Argentina, la incidencia de SUH es una de las más altas del mundo y ha sido reconocido como la causa más frecuente de insuficiencia renal aguda en los primeros años de vida, la segunda causa de insuficiencia renal crónica (Spizzirri y col., 1997), y es responsable del 20% de los trasplantes renales en niños y adolescentes, constituyendo una enfermedad endémica (Calletti y col., 2006). La incidencia de la enfermedad ha aumentado a través de los años registrándose actualmente aproximadamente 500 casos nuevos por año, con una tasa de hospitalización en el año 2008 de 17 casos cada 100.000 niños menores de 5 años. Se notificaron ese año 543 casos de los cuales el 54% correspondió al sexo femenino y el 54% de los sujetos tenían menos de 2 años, con una edad promedio de 36 meses. La mayoría de los casos (70%) ocurrieron durante los meses cálidos (desde octubre a marzo). La letalidad en la fase aguda fue del 2%. Algunos estudios muestran que en la mayoría de los casos de SUH posentérico (75%), el serogrupo prevalente fue *E. coli* O157:H7 (Rivas y col., 2011). En nuestro país el SUH se produce más frecuentemente como casos esporádicos. Debido a la dificultad para rastrear las vías de infección en los casos de SUH, se realizaron estudios tratando de establecer la etiología de la enfermedad y se encontró que algunos hábitos de consumo de alimentos se han relacionado con un mayor riesgo de infección por STEC, tales como comer carne mal o poco cocida, vivir o visitar un lugar con granja de animales, y el contacto con niños menores de 5 años de edad con diarrea (Rivas y col., 2008). En el año 2002 se pudo establecer una asociación entre un caso de SUH y el consumo de una hamburguesa casera contaminada (Rivas y col., 2003).

Aunque la incidencia de SUH fue aumentando a través de los años, la letalidad de la enfermedad fue disminuyendo debido al diagnóstico precoz de la misma y a la instauración

temprana de tratamientos paliativos. El tratamiento comprende medidas terapéuticas destinadas a corregir las alteraciones hidroelectrolíticas, hematológicas, neurológicas y de hipertensión arterial durante el período agudo. Hasta el presente no existe una terapia específica para las infecciones por STEC y si bien *E. coli* O157:H7 es susceptible a la mayoría de los agentes antimicrobianos utilizados comúnmente, el uso de antibióticos como terapia no es recomendado ya que podría precipitar la evolución a SUH. Algunos estudios *in vitro* muestran que el uso de antibióticos estimulan la liberación de Stx (Wong y col., 2000).

#### 1.8.2. Antecedentes de *E. coli* O157 en la cadena de la carne

Debido a la importancia de los productos cárnicos en los brotes de SUH, el ganado bovino ha sido foco de numerosos estudios para determinar su participación en la transmisión de la enfermedad. Desde el primer reporte de Ørskov en 1987 (Ørskov y col., 1987), en la que se informó que *E. coli* O157:H7 fue aislada de un ternero con diarrea en la provincia de Buenos Aires, se han realizado numerosos estudios en todo el mundo que han permitido confirmar al ganado vacuno como el principal reservorio de STEC O157 (Ferens y Hovde, 2011). Sin embargo, son menos los estudios que han evaluado la contaminación con STEC O157 en las distintas etapas de la faena, mediante el análisis de diferentes tipos de muestras, tales como el contenido fecal, la carcasa o el cuero de los animales (Elder y col., 2000; O'Brien y col., 2005). Recientemente, Rhoades y col. (2009), han examinado los datos de prevalencia de STEC y otros patógenos en la cadena de producción de la carne. Este tipo de estudios, sirven de base para evaluar el riesgo de STEC en esta cadena alimentaria (Cassin y col., 1998; Cummins y col., 2008; Rhoades y col. 2009).

En EEUU, luego de un gravísimo brote de enfermedad en 1993 causado por *E. coli* O157:H7 asociado al consumo de hamburguesas poco cocidas de una cadena de comidas rápidas, el Servicio de Inspección de Alimentos (FSIS, *Food Safety and Inspection Service*)

(1994) declaró a este microorganismo como un adulterante en carne picada e inició un programa de detección en carne molida cruda a nivel de plantas de procesamientos y en comercios minoristas. Sin embargo, para poder bajar la incidencia de enfermedad de *E. coli* O157:H7, en 1997 cambió la metodología de laboratorio, aumentando la cantidad de muestra de carne analizada de 25 a 325 g (tolerancia cero en 5 muestras de 65 g de carne molida). También en Septiembre de 1999, introdujo una prueba de laboratorio más sensible para la recuperación de *E. coli* O157:H7 basada en la separación inmunomagnética. Por estas razones, se aumentó la detección de esta bacteria que se encuentra en muy bajas concentraciones y con ello también se incremento el número de *recalls* o retiros de carne del mercado. El número de *recalls* bajó y se mantuvo controlado a partir del año 2002, a raíz de la reevaluación de los planes HACCP y de otras estrategias de mitigación tomadas por el FSIS para reducir la prevalencia de *E. coli* O157:H7, tales como procedimientos sanitarios de *dressing* e intervenciones con antimicrobianos (USDA, 2013).

A pesar de los numerosos antecedentes internacionales, en Argentina al inicio de este trabajo había relativamente muy pocos trabajos respecto de la incidencia y caracterización de cepas STEC O157 en el ganado bovino en pie y sobre todo durante su industrialización en frigoríficos locales. Hasta el momento la información disponible está basada en estudios parcializados, limitados por la focalización en ciertos aspectos y con metodologías empleadas que no tienen la sensibilidad requerida. Algunos estudios en carne picada indican un 32% de contaminación de la misma con STEC (Parma y col., 2000). Otro estudio realizado en el año 2001 por Chinen y col., mostró que la prevalencia del serotipo O157:H7 en carne picada fue del 3,8% de las muestras tomadas en comercios minoristas. Con respecto a la prevalencia en bovinos, un estudio epidemiológico realizado por Sanz (Sanz y col., 1998) en vacunos adultos sanos y terneros con diarrea a nivel de finca, utilizando PCR para detectar los genes *stx*, se

detectó un 38% de STEC, sin embargo en este trabajo no detectó la presencia del serotipo O157:H7. Estudios posteriores confirmaron la prevalencia de STEC no-O157, en 15,8% en terneros (Mercado y col., 2004), 26,6% en ganado de carne y leche (Parma y col., 2000), mientras que Meichtri y col. (2004), estudiaron la prevalencia de STEC en materia fecal de 200 novillos jóvenes previo a su faena y detectaron STEC de distintos serotipos en un 39% de los animales y solamente en un 0,5%, el serotipo fue O157:H7. Cabe destacar que uno de los factores determinantes en la estimación de STEC y en particular de de *E. coli* O157:H7, es la metodología utilizada en los diferentes estudios.

### 1.8.3. Situación de la Cadena de la Carne Argentina

Según datos estadísticos del USDA la región contribuye con 10,25 millones de toneladas de carne. Alrededor del 20% de la producción mundial; 49,748 millones de toneladas. De acuerdo con los datos del Instituto de Promoción de la Carne Vacuna Argentina (IPCVA), en nuestro país la faena de bovinos alcanza más de 15 millones de cabezas por año. Lo cual implica que se elaboraron alrededor de 2.452 mil de Tn, es decir una producción de 4.632 millones de dólares. La exportación de carne vacuna fresca y procesada alcanzan las 480 mil toneladas por año, equivalente a más de 1300 millones de dólares anuales (3000 u\$s/Tn). Esta situación coloca a nuestro país como el 5to productor y como 7mo exportador de carne vacuna a nivel mundial (Fuente: IPCVA).

Por otra parte, la carne vacuna es un componente tradicional de la dieta argentina, y aunque el consumo promedio fue bajando por razones económicas siendo en el año 2007 de alrededor de 69,4 kg *per cápita* al año y llegó en el año 2012 a 59,0 kg promedio (Fuente: IPCVA). Aún el consumo sigue siendo alto en comparación con otros países y la demanda está cubierta por una dinámica industria de ganado vacuno.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo General

El objetivo del trabajo de tesis fue determinar el nivel de contaminación con *E. coli* O157 del ganado vacuno faenado en nuestro país y evaluar la resistencia acida de los aislamientos obtenidos de *E. coli* O157 en las plantas frigoríficas. Para ello, se plantearon tres objetivos generales:

**A.** Estimar de forma representativa la Prevalencia de *E. coli* O157 en ganado bovino faenado en frigoríficos de la Argentina.

**B.** Caracterizar los aislamientos de *E. coli* O157 obtenidos para conocer su potencial patogénico y sus características epidemiológicas.

**C.** Estimar la influencia de la respuesta al estrés ácido de los aislamientos obtenidos.

### 2.2. Objetivos específicos

Enmarcados dentro de los objetivos generales definimos los siguientes objetivos específicos:

#### **Objetivo A:**

A1. Determinar de forma representativa la prevalencia de STEC O157 en materia fecal de bovinos de abasto a la entrada de la línea de faena y el grado de contaminación con EC O157 TSN.

A2. Estimar los índices de contaminación con STEC O157 y EC O157 TSN de las carcasas durante su procesamiento en los frigoríficos

A3. Establecer si existen patrones de incidencia de acuerdo con origen de las muestras.

**Objetivo B:**

B1. Caracterizar fenotípico y genotípicamente los aislamientos obtenidos.

B2. Estimar el potencial patogénico de las cepas de acuerdo a los factores de virulencia que presentan.

B3. Determinar la relación clonal de los aislamientos mediante técnicas de subtipificación molecular

**Objetivo C:**

C1. Cuantificar la respuesta al estrés ácido de los clones aislados de materia fecal y carcasa.

C2. Estimar la relación de la respuesta al estrés ácido y el perfil patogénico de las cepas estudiadas.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Estimación de la Prevalencia de *E. coli* O157 en ganado bovino faenado en frigoríficos de la Argentina

##### 3.1.1. Determinación de Prevalencia en Materia Fecal y Carcasa. Diseño del ensayo

Para diseñar un muestreo estadísticamente representativo de la faena en nuestro país se supuso una incidencia de STEC O157 del 5% en materia fecal en base al dato del 0,5% de prevalencia previamente obtenido por Meichtri y col. (2004). Este valor fue multiplicado por un factor de 10 como estimación del incremento en la sensibilidad esperado por el uso de la metodología de inmunocaptura. De acuerdo a esta frecuencia estimada, y considerando una precisión del 1,5% con un índice de confianza del 95%, se determinó utilizando el programa de estadística epidemiológica (OpenEpi, versión 2.3), analizar un total de 811 bovinos, 1622 muestras en total, 811 carcasas (CA) y 811 materias fecales (MF).

Desde Noviembre de 2006 hasta Abril de 2008 se colectaron muestras en nueve frigoríficos de exportación de Argentina seleccionados por la cantidad de ganado promedio faenado y también teniendo en cuenta las condiciones higiénico-sanitarias de los mismos. Se desarrolló un procedimiento de muestreo acordado con los frigoríficos y se brindó asistencia al personal designado por cada frigorífico para tal fin, a través de visitas, guías (Anexo 1) y videos demostrativos con el fin de homogeneizar el procedimiento de toma de muestra.

De cada lote de animales de procedencia conocida (30-60 animales) se analizaron las materias fecales y carcasas de 6 animales consecutivos en la línea de faena. Acorde a esto, en cada frigorífico se muestrearon de 14 a 18 lotes durante el período de estudio. Cada lote se identificó mediante un código compuesto por una letra correspondiente al frigorífico y un número de la visita a ese frigorífico, por ejemplo A-1, D-9, etc.

En cada muestreo se consignó una planilla acompañante con los siguientes datos: procedencia, raza, sexo, dentición, peso de la media res, localización geográfica de origen de la hacienda, así como también información respecto de régimen alimentario en campo y otras informaciones que se pudieran considerar *a priori* significativas en la incidencia de STEC O157 en las muestras (Anexo 2).

Previamente a cada jornada de toma de muestras, se enviaron a los frigoríficos las bolsas de muestreo con esponja, el caldo de hidratación para cada una (25 ml de agua peptonada), las bolsas de muestreo de MF, guantes descartables y todo el material extra necesario para el adecuado envío de las muestras al laboratorio.

### 3.1.2. Procedimiento de Muestreo de Materia Fecal (MF)

Las muestras de MF se tomaron en la bandeja de vísceras verdes. Allí se cortaron las ligaduras del recto de cada animal muestreado y se estrujó esta porción de intestino para producir la salida del contenido fecal. Luego se procedió a retirar en bolsas estériles tipo Whirl-Pak (Nasco, EEUU) una cantidad suficiente de MF, dentro de lo posible entre 30 a 50 g. Las bolsas se cerraron y se rotularon adecuadamente para ser enviadas al laboratorio. El procedimiento se observa en las imágenes de la Figura 5.

**Figura 5:** Toma de muestra de MF en la bandeja de vísceras verdes

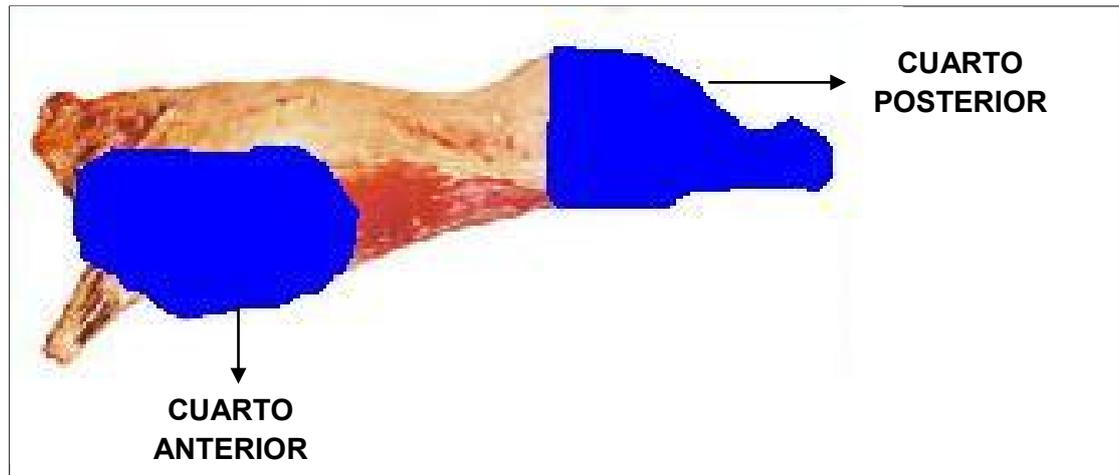


① Entrada de las vísceras a la bandeja. ② Corte de la ligadura del recto. ③ Estrujado para producir la salida de MF. ④ Salida de MF. ⑤ Toma de MF con la bolsa estéril. ⑥ Cerrado de la bolsa.

### 3.1.3. Procedimiento de muestreo de Carcasa (CA)

En el lapso de aproximadamente una hora después de la toma de muestra de materia fecal, las carcasas sin ningún tratamiento de descontaminación y provenientes de los mismos 6 animales, fueron esponjadas luego del lavado de las canales, y previo a la entrada a la cámara frigorífica. El muestreo de las carcasas consistió en esponjar 8000 cm<sup>2</sup> de la media res, 4000 cm<sup>2</sup> de la región anterior y 4000 cm<sup>2</sup> del cuarto posterior (Figura 6). Para esto, se siguió la técnica del Departamento de Agricultura de Estados Unidos para la investigación de incidentes de contaminación (USDA; U. S. Department Agriculture, Food Safety and Inspection Service (FSIS) methodology, 2005).

**Figura 6:** Esquema de la superficie de esponjado de la zona anterior y posterior de la carcasa



Para el esponjado se utilizaron bolsas de muestreo con esponja estériles (Whirl-Pak speci-  
sponge, Nasco, EEUU), rehidratadas con 25 ml agua peptonada. Primeramente se muestreo  
4000 cm<sup>2</sup> del cuarto anterior, con la esponja escurrida, realizando aproximadamente 10  
barridos de derecha a izquierda. Luego se invirtió la cara utilizada de la esponja y con la otra  
cara se esponjó el cuarto posterior de forma similar al anterior (otros 4000 cm<sup>2</sup>). Finalmente  
se cerró la bolsa asegurándose que la esponja de muestreo quede en contacto con el líquido  
remanente y se rotuló. Todo el procedimiento se realizó con guantes descartables estériles  
como se observa en las imágenes (Figura 7).

**Figura 7:** Toma de muestra de CA



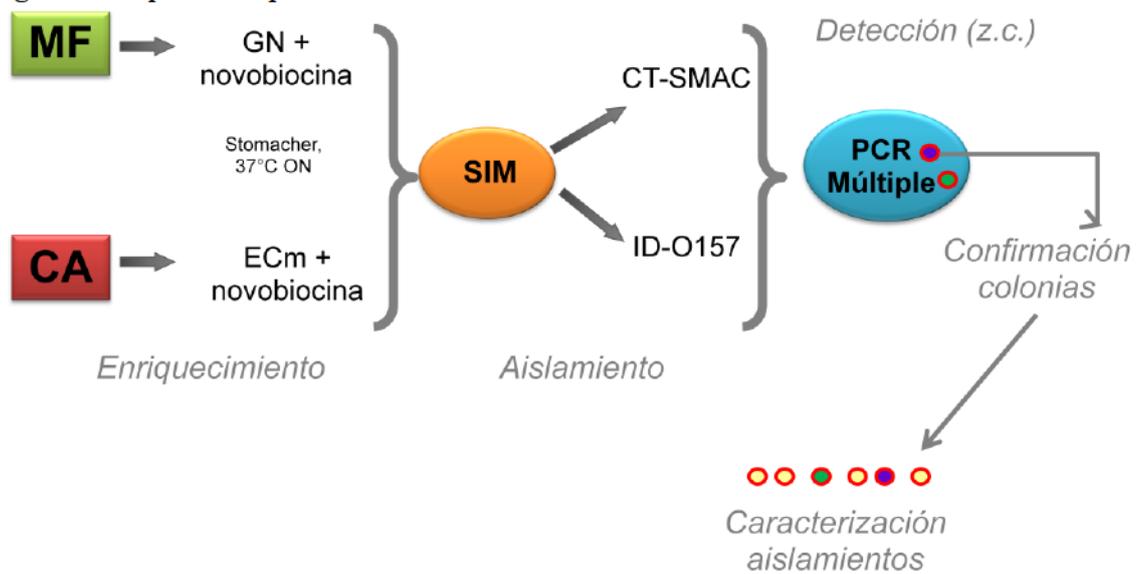
- ① Hidratación de la esponja. ② Esponjado del cuarto anterior. ③ Barridos de derecha a izquierda. ④ Inversión de la esponja. ⑤ Esponjado del cuarto posterior. ⑥ Cerrado de la bolsa.

Las muestras obtenidas fueron correctamente rotuladas, numeradas consecutivamente, refrigeradas y despachadas inmediatamente al laboratorio junto con la planilla de registro fueron, donde fueron procesadas para la detección de *E. coli* O157. El muestreo fue realizado por investigadores del ITA o por los veterinarios consignados en cada planta, debidamente entrenados de acuerdo al procedimiento descrito en la “Guía para los veterinarios de frigoríficos” (Anexo 1).

#### 3.1.4. Método de detección de *E. coli* O157

En el laboratorio las muestras fueron procesadas para la detección de *E. coli* O157 siguiendo el esquema simplificado de procedimiento que se observa en la siguiente figura (Figura 8):

**Figura 8:** Esquema simplificado del tratamiento de las muestras en el laboratorio



El procedimiento consta de cuatro pasos básicos: a) enriquecimiento de las muestras para la recuperación y aumento del número de las bacterias, b) el aislamiento de forma selectiva y la diferenciación de las *E. coli* O157, c) la detección y selección específica de dicho serotipo y d) la caracterización y la subtipificación de las cepas (Apartado 3.2). A continuación se describen los tres primeros pasos:

#### a) Enriquecimiento

Para el enriquecimiento de la MF se pesaron 10 g de muestra en bolsas con filtro (Whirl-Pack, Nasco, EEUU) y se homogeneizaron en 90 ml de caldo para Gram negativos, GN Hajna, (Difco, EEUU). Se incubaron a 37°C durante 5 h.

Las muestras de CA fueron enriquecidas por el agregado de 90 ml de caldo ECm (*E. coli* modificado, Difco, Becton-Dickinson and Company (BD), Francia) en las bolsas con esponja utilizadas. Luego fueron homogeneizadas en stomacher (Lab-Blender 400) e incubadas a 37°C durante 2 horas.

Luego de esta incubación, se adicionó Novobiocina (20 µg/ml, concentración final) (Merck KGaA, Alemania) en ambos caldos de enriquecimiento y se continuó la incubación por 18 h más a 37°C.

## **b) Aislamiento**

A partir de un mililitro del caldo de enriquecimiento se realizó la técnica de Separación Inmunomagnética (SIM), de acuerdo con una adaptación del método USDA/FSIS para el aislamiento de STEC O157:H7/NM en alimentos (USDA/ FSIS, 2002).

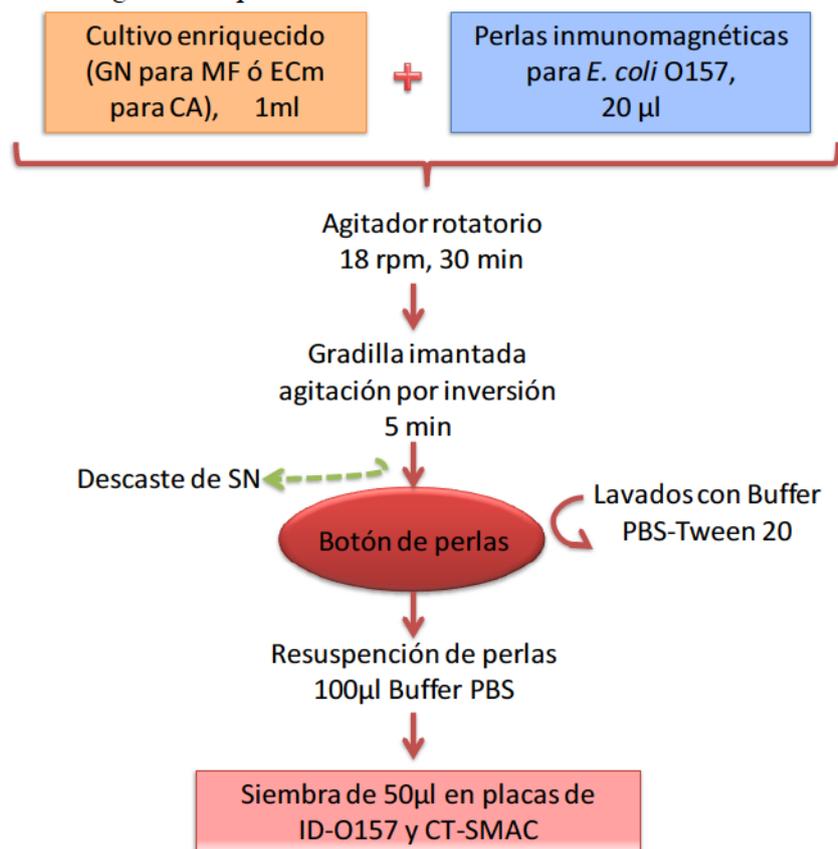
### **Técnica de Separación Inmunomagnética (SIM):**

El fundamento de la SIM es la separación de *E. coli* O157:H7/NM mediante la utilización de anticuerpos anti-O157 purificados, adsorbidos y unidos covalentemente a la superficie de partículas esféricas paramagnéticas, uniformes y microscópicas de poliestireno. Estas partículas son incubadas con el caldo enriquecimientos. Durante esta incubación, los anticuerpos se unen al antígeno somático presente en la pared bacteriana de *E. coli* O157:H7/NM. Luego, mediante utilización de un imán es posible concentrar las perlas con las bacterias adheridas. El concentrado es resuspendido en un buffer y a continuación, el mismo es sembrado para el aislamiento diferencial de *E. coli* O157:H7/NM en medios cromogénicos selectivos.

El procedimiento para realizar la SIM se esquematiza en la figura 9 y se ilustra en la figura 10. Se mezcló 1 ml del caldo de enriquecimiento, con 20 µl de perlas inmunomagnéticas (Neogen Corp., Lansing, MI) en un tubo eppendorf estéril. Se agitó 15 segundos en vórtex y se colocaron los tubos en un agitador rotatorio a 18 rpm durante 30 minutos, a temperatura ambiente. Luego, se colocaron los tubos en una gradilla imantada y se agitaron suavemente por inversión durante 5 minutos hasta observar un botón en la pared del tubo que se encuentra en contacto con el imán. Se extrajo el sobrenadante con precaución de no desprender las perlas de la pared y se quitó el imán de la gradilla. Luego, se procedió al lavado de las perlas agregando 1 ml de buffer PBS-Tween 20 al 0,02% (PBS, solución salina bufferada con fosfatos pH 7,2; Bio Rad Life Science, Florida, EEUU y Tween 20; USB

Corporation, Ohio, EEUU) y se resuspendieron las perlas. Se colocaron nuevamente los tubos en la gradilla con imán y se agitaron durante 3 minutos hasta observar de nuevo el botón en la pared. Se realizó de esta forma varios lavados (2 ó 3). Finalmente, se resuspendieron las perlas en 100  $\mu$ l de PBS 1X y se dispensaron 50  $\mu$ l en una placa de agar MacConkey Sorbitol (SMAC, Difco, BD, Le Pont de Claix, Francia) suplementadas con Cefixime-Telurito (BioMerieux, Francia) (CT-SMAC) y los otros 50  $\mu$ l restantes en una placa de agar ID-O157 (Chrom ID™ O157:H7, BioMerieux, Francia). Las placas se sembraron una mitad en forma confluyente y luego la otra mitad en forma diseminada para obtener colonias aisladas. Las placas se incubaron a 37°C durante 18 a 24 h.

**Figura 9:** Diagrama del procedimiento de SIM



**Figura 10:** Procedimiento para realizar la separación inmunomagnética (SIM) de las *E. coli* O157:H7/NM en el laboratorio



① Dispensación del enriquecido en un tubo eppendorf. ② y ③ Agregado de las perlas inmunomagnéticas ④ Incubación en un agitador rotatorio. ⑤ Colocación de los tubos en la gradilla imantada y agitación por inversión. ⑥ Formación del botón de perlas en la pared del tubo y eliminación del líquido. ⑦ Extracción del imán de la gradilla. ⑧ Agregado del buffer de lavado. ⑨ Siembra en las placas de las perlas resuspendidas.

### c) Detección

La detección de STEC O157, a partir del crecimiento de las zonas de confluencia de las placas de medios selectivos y diferenciales CT-SMAC y ID-O157, se realizó por PCR múltiple mediante una técnica validada por Leotta y col. (2005) para confirmar la portación de los genes *stx*<sub>1</sub>, *stx*<sub>2</sub> y *rfb*<sub>O157</sub>.

#### Reacción de la polimerasa en cadena (PCR) múltiple:

Se utilizaron tres pares de oligonucleótidos cebadores, un par amplifica un fragmento de 130 pb del gen *stx*<sub>1</sub>, correspondiente a la subunidad B de la toxina Stx1, otro par amplifica un

fragmento de 346 pb del gen *stx*<sub>2</sub>, correspondiente a la subunidad A de Stx2 y el tercer par de cebadores que amplifican un fragmento de 259 pb del gen *rfb*<sub>O157</sub> correspondiente a una proteína involucrada en la síntesis del LPS O157 (Karch y col., 1989). La cepa de referencia *E. coli* EDL933 (O157:H7, Stx1+/Stx2+) fue utilizada como control positivo de la reacción, como control negativo se empleó *E. coli* ATCC 25922 (sin factores de virulencia) y como control de reactivos se utilizó una mezcla sin templado.

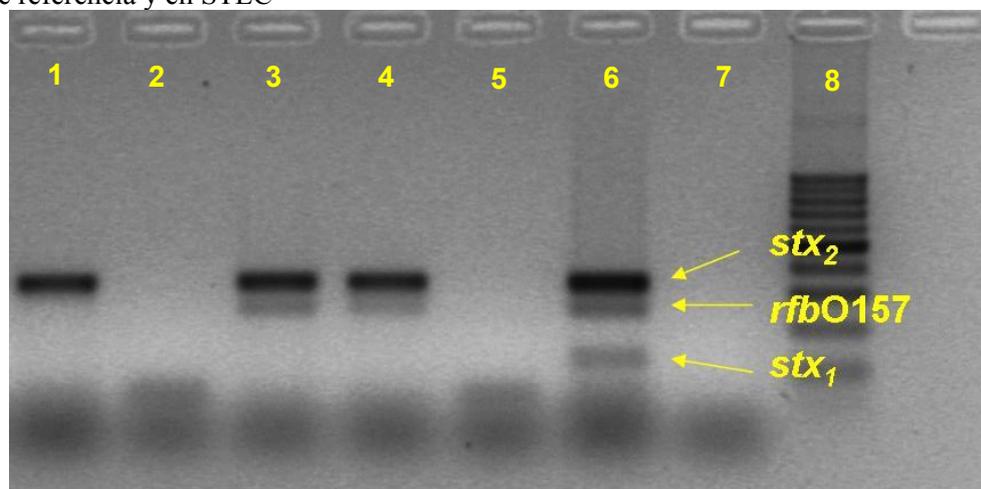
Para obtener el templado de ADN se tomó una ansada del cultivo y se resuspendió en 150 µl de buffer Tritón X-100 (USB Corporation, Ohio, EEUU) al 1% en buffer TE 1X [10 mM Tris-HCl (pH 8,0); 1 mM EDTA (pH 8,0)] y luego la mezcla se llevó a 100°C, durante 15 minutos y se centrifugó a 12000 rpm durante 5 minutos. De esta manera se obtuvo un pellet correspondiente al debris bacteriano y un sobrenadante donde se encuentra el ADN. Este extracto de ADN se conservó a 4°C para ser utilizado en la reacción de PCR ó se almacenó a -20°C si no se utilizó inmediatamente.

La mezcla de amplificación para una determinación consistió en 5µl de buffer de PCR 10X (provisto junto con la enzima); 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,1 mM de cada uno de los desoxinucleótidos trifosfato (dNTP, Invitrogen, Brasil); 0,2-1 pmol/µl de cada primer, 1U de *Taq* (*Thermus aquaticus*) ADN polimerasa recombinante (Invitrogen, Brasil), 2µl de templado y agua tridestilada para alcanzar 50µl de volumen final.

Para las reacciones de amplificación se utilizó un termociclador My Cycler<sup>TM</sup> Thermal Cycler (Bio-Rad Life Science, CA, EEUU). Las condiciones de amplificación consistieron en un paso inicial de desnaturalización a 94°C durante 5 min y 30 ciclos de: 30 seg a 94°C (desnaturalización), 30 seg a 58°C (hibridación) y 30 seg a 72°C (extensión); y un paso final de 72°C por 2 min (Leotta y col., 2005).

Los productos de amplificación se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa (Invitrogen, España) al 2% en buffer TAE 1X [40 mM Tris; 20 mM ácido Acético; 1 mM EDTA (pH 8,0), Bio-Rad Life Science, Florida, EEUU), adicionado con Bromuro de Etidio (BrEt 0.5µg/ml final, Promega, Madison, EEUU), junto con un marcador de peso molecular de 100pb (Cienmarker, Biodynamics SRL, Argentina). Se utilizó como buffer de siembra y frente de corrida 10µl Azul de Bromofenol al 0,25% en solución acuosa con glicerol al 30%, en 50 µl del ADN amplificado. La electroforesis se llevó a cabo en una cuba (Bio-Rad Life Science, CA, EEUU), con una fuente de poder PowerPac HC (Bio-Rad Life Science, CA, EEUU), a 80 v/cm durante 50 min y se utilizó como buffer de corrida TAE 1X. Los resultados se observaron en un transiluminador (UVP M20, Cambrigde, Inglaterra). De esta manera se pudieron diferenciar los tres productos de amplificación de acuerdo con los diferentes pesos moleculares como se observa en la figura 11.

**Figura 11:** Productos de amplificación por PCR para la detección de los genes *stx*<sub>1</sub>, *stx*<sub>2</sub> y *rfb*<sub>O157</sub> en cepas de referencia y en STEC

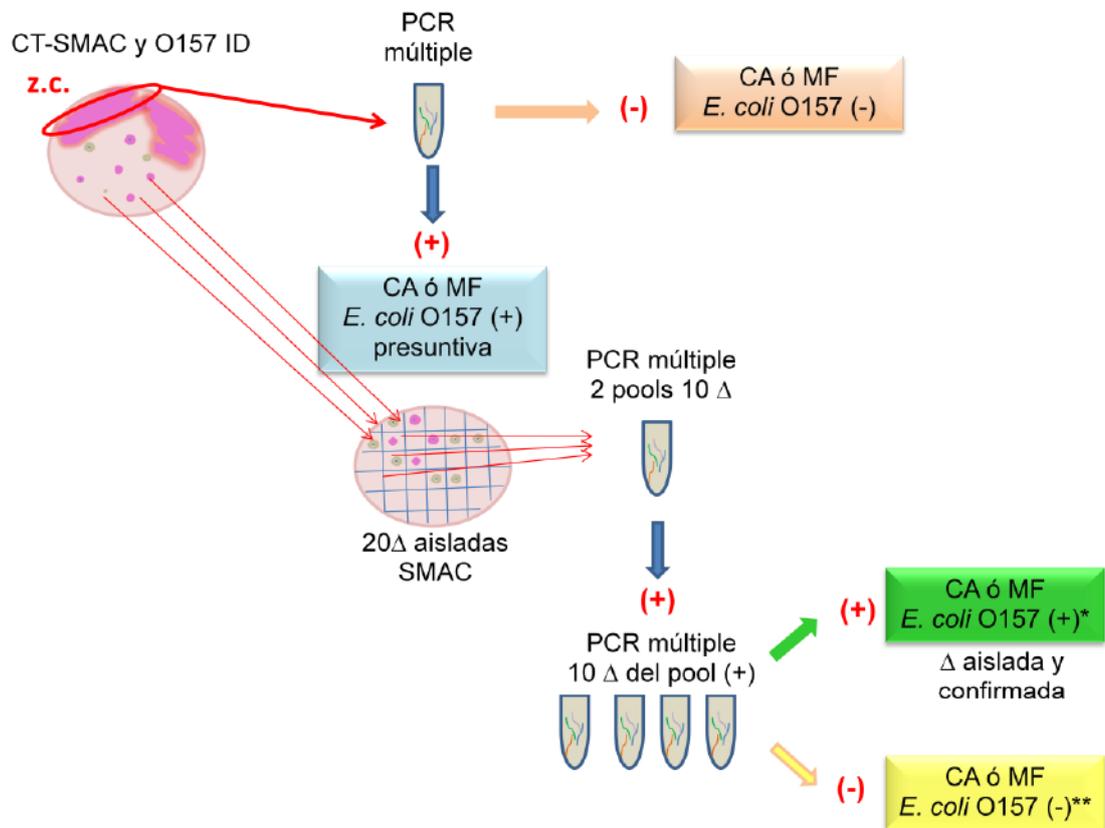


Calles 6: control positivo *E. coli* EDL933 *stx*<sub>1</sub>/*stx*<sub>2</sub>/*rfb*<sub>O157</sub>. Calles 3 y 4: *E. coli* O157:H7 *stx*<sub>2</sub>/*rfb*<sub>O157</sub>. Calles 1: STEC *stx*<sub>2</sub>. Calles 2 y 5: STEC O157 negativas. Calle 7: Control de reactivos sin templado. Calle 8: Marcador de peso molecular CienMarker.

Las condiciones individuales de amplificación y las secuencias de los cebadores de las PCR utilizadas se describen en el Anexo 3.

A partir de aquellas placas cuya zona de confluencia mostraron bandas de amplificación por PCR múltiple (positivo presuntivo), se repicaron al menos 20 colonias a una placa grillada de SMAC para su aislamiento e identificación de cepas (positivo confirmado) como se muestra en el esquema de recuperación (Figura 12). En los casos donde la zona de confluencia resultó positiva para *rfb*<sub>O157</sub> y *stx*, se tomaron las colonias características en cada medio de cultivo, en ID-O157, se repicaron colonias color verde a verde-azulado, y colonias incoloras en CT-SMAC. Mientras que en los casos donde la zona de confluencia resultó positiva solo para *rfb*<sub>O157</sub>, se repicaron distintos tipos de colonias características de *E. coli* O157:H7 en los medios de cultivos utilizados pero también colonias características de *E. coli* genérico, es decir, colonias rosadas a violeta en ID-O157 y colonias de color rosa a rojas en CT-SMAC, con el objetivo de recuperar de estas muestras, cepas EC O157 TSN. Las colonias aisladas se analizaron en 2 pooles de 10 colonias sospechosas cada uno. En los casos donde el resultado de la PCR múltiple de la zona de crecimiento confluyente fue negativo, se consideró que la muestra era negativa para *E. coli* O157. Por el contrario, si la zona de confluencia fue positiva y también uno de los pooles, cada una de las colonias presuntivas se analizó por PCR múltiple para identificar la colonia portadoras del gen *rfb*<sub>O157</sub>, las cuales se reaislaron en agar Tripteína de Soja (TSA, Oxoid LTD, Hampshire, Inglaterra) para su confirmación (Figura12). Una vez aislada y confirmada como *E. coli* O157 por PCR múltiple, se considero como una cepa única a la cual se la rotulo con la nomenclatura definida del laboratorio y se almacenó adecuadamente para su posterior caracterización. Las cepas aisladas fueron mantenidas a -70°C en crioperlas (AES Laboratoire, Ker Lann, Francia) y también en caldo Tripteína de Soja (TSC, Oxoid LTD, Hampshire, Inglaterra) con 30% de glicerol a -20°C, como cultivo de trabajo. El ADN obtenido a partir de las mismas fue almacenado a -20°C por un período no mayor a tres meses.

**Figura 12:** Esquema de recuperación de cepas y confirmación de muestras presuntamente *E. coli* O157 positivas (STEC O157 y EC O157 TSN) por PCR múltiple a partir de las zonas de confluencia de los medios selectivos



\* muestra presuntiva y confirmada.

\*\* muestra presuntiva. No confirmada.

### 3.2. Caracterización de los aislamientos de *E. coli* O157 obtenidos para conocer su potencial patogénico y sus características epidemiológicas

Las cepas *rfb*<sub>O157</sub> positivas, aisladas y confirmadas por PCR (Figura 12), fueron rotuladas y mantenidas en condiciones adecuadas de conservación para su caracterización fenotípicas.

#### Caracterización fenotípica de los aislamientos

La caracterización fenotípica se realizó mediante pruebas tintoriales, morfológicas y bioquímicas para identificar *E. coli* y las pruebas específicas para el serotipo O157 (Ewing, 1986), serotipificación, citotoxicidad específica en células Vero, sensibilidad a antibióticos y hemólisis de glóbulos rojos.

### 3.2.1. Identificación bioquímica general

A los aislamientos presuntivos de *E. coli* se les realizó una identificación bioquímica básica con las siguientes pruebas: Producción de Indol, movilidad y producción de ácido sulfhídrico en agar Indol Movilidad Sulfuro (IMS, Laboratorios Britania, Argentina), fermentación de Glucosa, Lactosa y producción de gas en agar Triple Azúcar Hierro (TSI, Laboratorios Britania, Argentina), descarboxilación de Lisina (en agar Lisina Hierro, LIA, Laboratorios Britania, Argentina), fermentación ácido mixta (en caldo rojo de metilo-Voges Proskauer, RM/VP, Oxoid LTD, Hampshire, Inglaterra), descarboxilación de Ornitina (agar Movilidad Indol Ornitina, MIO, Laboratorios Britania, Argentina), producción de Ureasa (agar Urea de Christensen (UC), Oxoid LTD, Hampshire, Inglaterra), producción de Fenilalanina Desaminasa (medio con agar fenilalanina, Laboratorios Britania, Argentina), utilización de Citrato como fuente de carbono (agar Citrato de Simmons (CS), Oxoid LTD, Hampshire, Inglaterra), fermentación de hidratos de carbono: Rafinosa, Sorbitol, Celobiosa, Ramnosa, Dulcitol, Lactosa, Sacarosa (Sigma Chemical CO, St. Louis, EEUU) y Glucosa (Merck KGaA, Alemania), en caldo Rojo Fenol (RF, Difco, Becton-dickinson and Company (BD), Francia) conteniendo un 1% del azúcar correspondiente, actividad  $\beta$ -glucoronidasa (disco con Glucorónido, MUG, Lab. Biokar, Argentina), actividad  $\beta$ -galactosidasa (disco con ONPG, Lab. Britania) y producción de pigmento amarillo. Las pruebas se realizaron siguiendo las técnicas como indica MacFadin (3° Ed.) o en algunos casos el fabricante del medio de cultivo y se diferenció *E. coli* genérico, el serotipo O157:H7/NM y *E. hermanii* de acuerdo con la clasificación del Manual de Procedimiento para la detección de STEC O157 en Alimentos (2008, pág. 74) (Tabla 1).

**Tabla 1:** Pruebas bioquímicas básicas para diferenciar cepas del género *Escherichia*

Pruebas Bioquímicas	Medio utilizado	Bacteria		
		<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> O157:H7/NM	<i>E.hermanii</i>
Fermentación de glucosa	TSI/RF	+	+	+
Fermentación de lactosa	TSI/RF	+	+	-
Fermentación de sacarosa	TSI/RF	+	+	+
Formación de ác. Sulfhídrico	TSI/IMS	-	-	-
Producción de gas	TSI	+	+	+
Utilización de citrato	CS	-	-	-
Producción de indol	IMS	+	+	+
Movilidad	IMS/MIO	M/NM	M/NM	M
Fermentación de sorbitol	RF	+	-	-
Actividad $\beta$ -glucoronidasa	MUG	+	-	-
Actividad lisina descarboxilasa	LIA	+ (90%)	+ (100%)	- (6%)
Actividad ornitina descarboxilasa	MIO	+ (95%)	+ (100%)	+ (100%)
Fermentación de celobiosa	RF	- (2%)	- (2%)	+ (97%)
Producción de ureasa	UC	-/+	-/+	-
Producción de pigmento amarillo	TSA	- (0%)	- (0%)	+ (98%)

### 3.2.2. Biotipificación

Las cepas de *E. coli* O157:H7/NM se clasifican en los biotipos A, B, C, D, según la capacidad de fermentar los azúcares rafinosa, dulcitol y ramnosa. Para tal fin se procedió como se describió anteriormente en la fermentación de hidratos de carbono y se clasificaron los aislamientos de acuerdo con la tabla 2.

**Tabla 2:** Biotipos de *E. coli* O157:H7 de acuerdo a la fermentación de azúcares

Prueba	Biotipo <i>E. coli</i> O157:H7			
	A	B	C	D
Rafinosa	+	+	+	+
Dulcitol	-	+	+	-
Ramnosa	-	-	+	+

### 3.2.3. Producción de Enterohemolisina

Para la determinación de las cepas productoras de enterohemolisina (EHEC-Hly) se siguió la técnica propuesta por Beutin y col. (1989), para lo cual se emplearon placas con agar Base Triptosa (Difco, Becton-Dickinson and Company (BD), Francia) suplementado con 10 mM de  $\text{Cl}_2\text{Ca}$  (Sigma) y 5% de sangre de oveja desfibrinada lavada con PBS estéril, pH 7,2. Como control se emplearon placas de agar Base Triptosa con 5% de sangre desfibrinada de oveja sin lavar y sin el agregado de  $\text{Cl}_2\text{Ca}$ . Se sembraron ambas placas en paralelo con cultivos jóvenes de las cepas a investigar y a las tres horas de incubación a 37°C se realizó una primera lectura para la detección de  $\alpha$ -hemólisis ( $\alpha$ -Hly) y se volvió a incubar hasta 18 h para una segunda lectura de hemólisis para EHEC-Hly. El aislamiento se consideró no productor de EHEC-Hly si después de 3 h de incubación se observa  $\alpha$ -Hly en la placa de ensayo y en la placa control. Si no se observaba hemólisis se continuó con la incubación. Si después de 18 h se observó una fina hemólisis sólo en la placa de ensayo con los glóbulos rojos lavados, la cepa se consideró productora de EHEC-Hly. Si la hemólisis aparece en ambas placas, se consideró que la cepa es productora de  $\alpha$ -Hly.

### 3.2.4. Producción de Toxina Shiga

Para determinar la producción de toxina Shiga se utilizó la técnica “Gold Standard” de citotoxicidad específica en células Vero siguiendo la metodología propuesta por Karmali y col. (1985). Para tal fin, se utilizó el sobrenadante de cultivo en fase exponencial y el extracto del periplasma celular para determinar la actividad citotóxica de Stx1 y Stx2, respectivamente. El cultivo bacteriano se realizó en caldo Penassay (Medio de Antibióticos N°3, Difco). El ensayo de citotoxicidad se realizó en cultivos de células Vero en microplacas (Nunclon de 96 pocillos). Se controló el estado del cultivo con un microscopio óptico invertido. El efecto citotóxico se observó por tinción de la monocapa con una solución de

cristal violeta (0,75% en metanol 40%). Las cepas de referencia utilizadas fueron: *E. coli* O157:H7 C948 y 1271-84, productoras de Stx1 y Stx2, respectivamente.

### 3.2.5. Sensibilidad a antimicrobianos

A todos los aislamientos *rfb*<sub>O157</sub> positivos se les determinó la susceptibilidad a diferentes agentes antimicrobianos utilizando el método de difusión de discos en agar de Kirby-Bauer (Bauer y col., 1966). Se utilizaron discos con los siguientes antibióticos (BBL, Becton-Dickinson and Company (BD), MD, EEUU): amikacina 30 µg (AKN), ampicilina 10 µg (AMP), ciprofloxacina 5 µg (CIP), cloranfenicol 30 µg (CMP), colistina 10 µg (COL), gentamicina 10 µg (GEN), ácido nalidíxico 30 µg (NAL), nitrofurantoína 300 µg (NIT), estreptomina 10 µg (STR), tetraciclina 30 µg (TET) y trimetoprima-sulfametoxazol 1,25 µg (TMS), en Agar Base para antibióticos (Difco, Becton-Dickinson and Company (BD), Francia). El antibiograma se realizó a partir de cultivos frescos monomicrobianos con colonias bien aisladas. Para el inóculo se preparó una suspensión bacteriana a partir de una colonia hasta obtener una turbidez correspondientes al testigo 5 de las escala de McFarland (Cl<sub>2</sub>Ba 0,5%). Los aislamientos fueron clasificados como sensibles (S) o resistentes (R) para cada antibiótico midiendo los halos de inhibición alrededor del disco, de acuerdo con las normas establecidas por CLSI/NCCLS (Clinical and Laboratory Standards Institute y National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2003).

### 3.2.6. Serotipificación

La detección del antígeno somático O se realizó por aglutinación en lámina con antisuero policlonal anti-O157 provisto por el Instituto Nacional de Producción de Biológicos-ANLIS “Dr. Carlos Malbrán” y para la detección del antígeno flagelar H se utilizó el antisuero específico anti-H7 (*E. coli* Set 2; Denka Senken Co. LTD., Tokio, Japón) según la metodología propuesta por Ørskov y Ørskov (1984). Para identificar el antígeno flagelar H se

realizó la estimulación previa de la movilidad de la bacteria en el medio Craigie (Manual de Procedimientos, Servicio de Fisiopatogenia, 2008).

### **Caracterización genotípica de los aislamientos**

#### 3.2.7. Detección genotípica de factores de virulencia

En todas las cepas aisladas los genes *stx*<sub>1</sub>, *stx*<sub>2</sub> y *rfb*<sub>O157</sub> se detectaron por PCR múltiple como se describió anteriormente. La caracterización genética se completó con la detección por PCR de otros factores de virulencia. El gen *eae* de Intimina fue investigado como describe Karch y col. (1993). Para la detección de los genes *ehxA* de la enterohemolisina y *saa* de la Adhesina Aglutinante de STEC, se siguieron las condiciones utilizadas por Schmidt y col. (1995) y Paton y col. (2001), respectivamente. La detección del antígeno flagelar se realizó por la amplificación del gen *fliC*<sub>H7</sub> (Flagellina H7) utilizando las condiciones descritas por Gannon y col. (1997). La cepa de *E. coli* O157:H7 EDL933 fue utilizada como control positivo de todas las reacciones de PCR. Los productos de amplificación fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa como se describió anteriormente. Las condiciones individuales de amplificación y las secuencias de los cebadores de las PCR utilizadas se describen en el Anexo 3.

### **Subtipificación de los aislamientos**

#### 3.2.8. Determinación de las variantes de toxina Shiga

Las variantes de *stx*<sub>1</sub> se determinaron de acuerdo con Zhang y col. (2002) y las variantes de *stx*<sub>2</sub> de acuerdo con Tyler y col. (1991) y Pièrard y col. (1998) por RFLP (Fragmentos de restricción de longitud polimórfica (*restriction fragment length polymorphism*)) de una secuencia específica de la subunidad B de Stx amplificada por PCR (PCR-RFLP).

Para la caracterización genotípica de *stx*<sub>2</sub> se utilizaron cebadores que amplifican un fragmento de 285 pb de la región del gen *stx*<sub>2</sub> y de las variantes *stx*<sub>2vh-a</sub> y *stx*<sub>2vh-b</sub> y simultáneamente, en una segunda PCR, se utilizaron otros cebadores que amplifican un fragmento de 385 pb de los genes de las variantes *stx*<sub>2vh-a</sub> y *stx*<sub>2vh-b</sub> (Condiciones de amplificación y secuencias de cebadores, Anexo 3) y de este modo se puede discernir, según se obtengan dos amplicones (285 y 385 pb) o uno solo (285 pb), si existen variantes o si se trata de *stx*<sub>2</sub>. En este último caso no se procede a la digestión enzimática. Por el contrario, si existen variantes, entonces se realiza la restricción enzimática del amplicón con *Hae*III, *Rsa*I y *Nci*I.

Para determinar las variantes de *stx*<sub>1</sub> por PCR-RFLP se utilizaron oligonucleótidos iniciadores que amplifican un fragmento de 282 pb de la región del gen correspondiente a la subunidad B para *stx*<sub>1</sub> y *stx*<sub>1c</sub> (Condiciones de amplificación y secuencias de cebadores, Anexo 3). Luego se determinó las variantes por la longitud de los fragmentos obtenidos con la restricción enzimática con *Hha*I del amplicón.

### 3.2.9. Fagotipificación

La fagotipificación se realizó siguiendo el método propuesto por Ahmed y col. (1987) y ampliado por Khakhria y col. (1990). Se utilizó un set de 16 fagos provistos por el Dr. Ahmed del Centro Canadiense de Salud Humana y Animal (Winnipeg, Manitoba, Canadá), los cuales permiten diferenciar 87 fagotipos.

### 3.2.10. Subtipificación molecular de los aislamientos

Para determinar la relación clonal de los aislamientos se analizaron fragmentos de macrorrestricción de cada cepa, separados por electroforesis en campo pulsado (PFGE, pulsed-field gel electrophoresis) siguiendo un protocolo estandarizado de 24 h de la red PulseNet para *E. coli* O157:H7 (Ribot y col., 2006). Los fragmentos fueron obtenidos por la digestión del ADN total por la enzima de restricción *Xba*I (Promega, Madison, WI, EEUU) y

en los casos necesarios se utilizó una segunda enzima *BlnI* (Promega) bajo las mismas condiciones.

Todas las cepas se inocularon inicialmente en TSA a 37°C, durante 14 a 18 h. Las bacterias de la zona de confluencia se recogieron con un hisopo estéril y se resuspendieron en 2 ml de buffer de Suspensión Celular (BSC, Tris 100 mM: EDTA 100 mM, pH 8) hasta alcanzar una turbidez de 0,35-0,4 en un MicroScan (Dade Berhing, Atlanta, EEUU). Los “plugs” o tacos fueron preparados a partir de 400 µl de suspensión celular estandarizada con 400 µl de agarosa SeaKen Gold 1% fundida (SeaKen, FMC Bioproducts, Maine, EEUU) y 20 µl de solución de Proteinasa K [20 mg/ml (Roche Diagnostics GMBH, Mannheim, Alemania)]. Las células dentro de los “plug” de agarosa se lisaron con un buffer de lisis celular [Tris 50 mM: EDTA 50 mM, pH 8; + Sarcocina (Sigma, Saint Louis, EEUU) 1% y Proteinasa K (0,1 mg/ml)], incubados a 54°C, durante 1,5-2 h con agitación vigorosa (120 rpm) y luego los plug se lavaron dos veces con agua de calidad molecular a 50°C, con agitación vigorosa durante 10-15 min y 4 veces con buffer TE 1X estéril (Tris 10 mM: EDTA 1 mM, pH 8). Los bloques se almacenaron en buffer TE 1X a 4°C hasta realizar la restricción enzimática.

La digestión del ADN en los “plugs” se realizó con la endonucleasa de restricción *XbaI* (30 U) en 200 µl del buffer de restricción 1X (provisto con la enzima), a 37°C, durante 1,5 a 2 h. La segunda enzima *BlnI* se utilizó en una segunda etapa, procediendo de manera análoga, luego de obtenerse los patrones de *XbaI*-PFGE, a fin de confirmar la identidad de las cepas que resultaron idénticas con la primera enzima.

Los “plugs” se colocaron en un gel de agarosa SeaKem Gold 1% en buffer TBE 0,5X [Tris 5,4 g; ácido bórico (Sigma) 2,75 g; 2,0 ml EDTA 0,5 M] en un molde (BioRad) de 150 ml de 15 calles. El gel armado se colocó en un marco ubicado en la cuba de electroforesis y se

realizó la corrida electroforética con un equipo de electroforesis de campo pulsado, CHEF DR III (BioRad), utilizando las siguientes condiciones: Pulso inicial: 2,2 seg; pulso final: 54,2 seg; voltaje: 6 V/cm; ángulo: 120°; tiempo de corrida: 19 h; con temperatura de buffer de corrida (TBE 0,5X) de 14°C. Se colocó el ADN de una cepa de *Salmonella* serovar Braenderup H9812, digerido por las mismas enzimas, en dos carriles externos y uno central en cada gel, para permitir la normalización de las bandas entre los geles. Los geles fueron teñidos con BrEt 0,1 µg/ml, durante 20 a 30 min a temperatura ambiente en un agitador orbital a 60 rpm, y luego se destiñó mediante 3 lavados con 400 ml de agua tridestilada en las mismas condiciones. Para la documentación de los resultados los geles fueron fotografiados en un transiluminador de UV, utilizando un sistema de documentación Gel Doc 2000 (BioRad, Hércules, CA). Las imágenes fueron registradas y almacenadas en formato TIFF. La presencia de bandas se determinó visualmente y los patrones de PFGE obtenidos fueron analizadas con el programa BioNumerics versión 4.0 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Bélgica), utilizando el coeficiente de Dice y mediante UPGMA para generar un dendograma con 1,5% de valor de tolerancia.

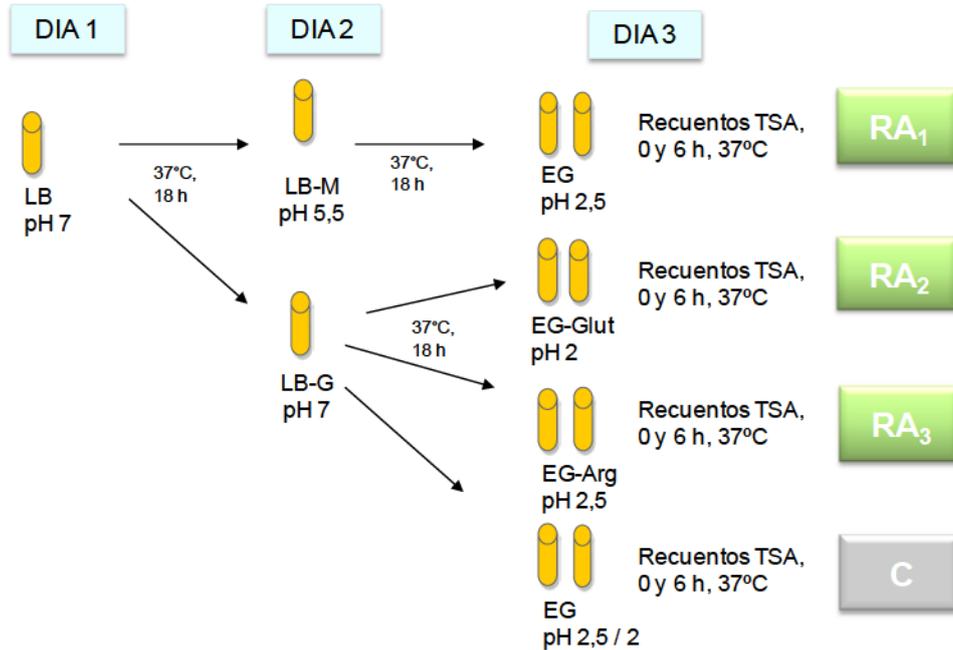
### **3.3. Estimación de la respuesta al estrés ácido de los aislamientos obtenidos**

#### **3.3.1. Ensayo de Resistencia Ácida (RA)**

Diseño del ensayo:

El diseño del ensayo para la determinación de RA de las bacterias por los tres mecanismos de resistencia a probar se observa en el esquema de la figura 13. Se probaron el Sistema Oxidativo o dependiente de Glucosa, denominado mecanismo RA1; el mecanismo dependiente de Glutamato, RA2; y el mecanismo dependiente de Arginina, RA3. También se realizó un control de muerte celular (C) en el desafío ácido sin ningún mecanismo protector.

**Figura 13:** Esquema del ensayo para la determinación de RA



Cepas seleccionadas:

De las 102 cepas *E coli* O157 aisladas y caracterizadas fenotípicamente y genotípicamente, se seleccionó una cepa de cada patrón de PFGE obtenido en la subtipificación, de tal manera que en el caso de los *clusters* se seleccionó al azar un representante de cada grupo, para estudiar la respuesta al estrés ácido. Por lo tanto se estudió la resistencia ácida de 65 cepas, treinta STEC O157 y 35 EC O157 TSN.

Preparación del inoculo para el desafío ácido:

A partir de crioperlas (AES Laboratorios, Ker Lann, Francia) con las cepas mantenidas a -80°C, se realizaron cultivos stock en TSC (pH 7,2), los que se conservaron con glicerol (30%) a -20°C hasta el momento del ensayo de desafío. Los cultivos stock fueron activados dos días previos al ensayo por crecimiento *overnight* en LB a 37°C.

Medios de cultivos utilizados:

Para generar los distintos inóculos para los ensayos de RA se utilizaron como medios de cultivo de preparación para el desafío, los caldos Luria Bertani (LB pH 7) (Difco, BD, Le

Pont de Claix, Francia), LB con 0,4% glucosa (Merck) (LB-G) y LB bufferado a pH 5,5 con 0,1M de ácido morfolinetanosulfónico (Sigma Life Science, St Einheim, Alemania) (LB-M).

El desafío ácido, se realizó en un medio mínimo modificado (EG; Large y col., 2005), conteniendo: 73mM de  $K_2HPO_4$ , 0,8mM  $MgSO_4$ , 17mM  $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ , 10mM de citrato de amonio y con 0,4% de Glucosa. El medio EG se utilizó sólo (EG, pH 2 ó 2,5) o EG suplementado con 0,6mM Arginina (Sigma Life Science, St Einheim, Alemania) (EG-Arg, pH 2,5) o con el agregado de 5,7mM Glutamato de Sodio (Sigma Life Science, St Einheim, Alemania) (EG-Glut, pH 2,0) de acuerdo con el mecanismo de resistencia en estudio (RA3 o RA2, respectivamente). Todos los medios fueron preparados, llevados al pH correspondiente con HCl 4N y esterilizados por filtración. Para los recuentos se utilizó TSA y agua peptonada 0,1% (Oxoid LTD., Hampshire, Inglaterra) para las diluciones.

Determinación de la respuesta de RA:

Día 1: se tomaron 100ul del cultivo activado en TSC de cada cepa a estudiar y se inocularon a 10 ml de LB y se incubó *overnight* (ON) a 37°C. Luego de este tiempo, aproximadamente 18 horas, las curvas de crecimiento indican que los cultivos de *E. coli* alcanzan la fase estacionaria de crecimiento (aproximadamente  $10^9$  UFC/ml).

Día 2: A partir de los LB crecidos, se inocularon 100 µl en 10ml de LB-M pH 5,5 sin glucosa para estudiar RA1 y en LB-G pH 7 (con Glucosa), para inactivar RA1 y poder estudiar RA2 y RA3, y también para el C. Estos medios se incubaron ON a 37°C. Luego de la incubación se realizaron recuentos de los cultivos previos para corroborar la concentración inicial antes del desafío ácido.

Día 3: para determinar el mecanismo RA1, se tomó 1 µl de LB-M pH 5,5 y se inoculó a 1 ml de caldo EG pH 2,5. Mientras que para determinar los otros mecanismos de RA se inocularon los medios de desafío a partir de LB-G pH 7. Para el sistema de RA2 se inoculó en

1 ml de medio EG-Glut pH 2,0; para el mecanismo RA3 se utilizó un medio EG-Arg pH 2,5 y como control de los desafíos se inóculo un caldo EG pH 2,0 y 2,5 sin el suplemento de ningún aminoácido. Todos los medios de desafío se incubaron a 37°C en un bloque térmico (Zeltec, ZC100, Argentina). Todos los medios de desafío se inocularon en una dilución 1/1000 para tener un inóculo inicial de aproximadamente  $10^6$  UFC/ml. Para todas las cepas se probaron 2 réplicas para cada mecanismo de resistencia (Figura 13).

Para determinar la supervivencia de las cepas se tomaron muestras al tiempo cero (0 h) y a las 6 horas de la inoculación en los medios de desafío. Las muestras fueron plaqueadas en TSA por duplicado, utilizando un autosembrador en espiral, Spiral Plater (Interscience, St Nom Breteche, Francia). Las placas fueron incubadas a 37°C, durante 24 h.

Día 4: se realizó la enumeración de colonias utilizando un equipo contador semiautomático para siembras en espiral, Scan 500 (Interscience, St Nom Breteche, Francia), se promediaron los duplicados de las placas, obteniéndose las UFC/ml de cada replica (N). Los recuentos fueron convertidos a valores logarítmicos, es decir  $\log$  (UFC/ml).

### 3.3.2. Análisis de la respuesta de RA

Se determinó el número de reducciones logarítmicas (NRL) o disminución del logaritmo del recuento celular entre el valor al inicio del ensayo ( $N_i = 0$  h) y el tiempo final ( $N_f = 6$  h), con el objeto de tener valores positivos [ $NRL = \log(N_i - N_f)$ ]. De esta manera se obtuvieron dos valores de NRL para cada cepa estudiada (2 réplicas). Dado que los NRL no tienen una distribución normal (Bergholz y Whittam, 2007), para el análisis estadístico se usó la prueba de análisis de varianza para datos no paramétricos de Kruskal-Wallis, utilizando el software estadístico InfoStat (versión 2014).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Estimación de la Prevalencia de *E. coli* O157 en ganado bovino faenado en frigoríficos de la Argentina

#### 4.1.1. Prevalencia de *E. coli* O157

Para determinar la prevalencia de *E. coli* O157 en ganado bovino se muestrearon 811 animales durante el proceso de faena realizado en nueve diferentes frigoríficos, donde se muestrearon tanto las carcasas (CA) como las materias fecales (MF), lo cual hizo un total de 1622 muestras analizadas.

Como se mencionó anteriormente, el muestreo se inició a mediados de noviembre de 2006 y continuó hasta abril de 2008, durante aproximadamente 18 meses consecutivos. En cada visita a un frigorífico se muestrearon, con algunas pocas excepciones, las MF y CA de 6 animales de cada lote, consecutivos en la línea de faena, a fin de contar con muestras de heces y canales del mismo animal. La capacidad de análisis disponible en el laboratorio determinó que se pudieran estudiar entre 24 a 36 muestras semanales. Cada establecimiento fue visitado entre 14 y 18 veces durante el período de muestreo. Y si bien se trató de que todos los frigoríficos fueran visitados igual número de veces el número de visitas dependió de la disponibilidad de cada establecimiento.

La presencia presuntiva de *E. coli* O157, con o sin toxina Shiga, se determinó por medio de la reacción de PCR múltiple. Cada muestra con una señal presuntiva para *E. coli* O157 se continuó analizando a fin de obtener una colonia aislada. Una vez confirmada como *E. coli* O157, la cepa se almacenó adecuadamente para su posterior caracterización (Figura 12). Cada muestra con una cepa de *E. coli* O157 aislada, se consideró como una muestra confirmada. Las cepas de *E. coli* O157 aisladas, podían poseer, además del gen *rfb*<sub>O157</sub>, los genes *stx*<sub>2</sub> y/o *stx*<sub>1</sub>, esto permitió diferenciar las muestras positivas para **STEC O157**, de las muestras

positivas para *E. coli* O157 toxina Shiga negativas (**EC O157 TSN**). La prevalencia obtenida tanto en MF como en CA se observan en la siguiente tabla.

**Tabla 3:** Prevalencia de *E. coli* O157 en materias fecales (MF) y carcasas (CA) en el ganado bovino

Tipo de Muestra	N° Muestras	N° Muestras <i>E. coli</i> O157 confirmadas		N° Muestras STEC O157 confirmadas		N° Muestras EC O157 TSN confirmadas	
			%		%		%
<b>MF</b>	811	71	8,8	33	4,1	38	4,7
<b>CA</b>	811	28	3,5	21	2,6	9	1,1
<b>Total</b>	1622	99	6,1	54	3,3	47	2,9

De las 1622 muestras analizadas, 99 (6,1%) fueron *rfb*<sub>O157</sub> positivas, y de estas, 54 (3,3%) muestras fueron STEC O157 confirmadas ya que las cepas aisladas presentaban además el gen *stx*<sub>1</sub>, o *stx*<sub>2</sub>, ó ambos; y por lo tanto se consideraron potencialmente patógenas. Mientras que de las restantes 45 muestras *E. coli* O157 confirmadas se aislaron cepas EC O157 TSN. Además, hubo 2 muestras de donde se aislaron ambos tipos de cepas, una STEC O157 y una EC O157 TSN. Por lo tanto, el total de muestras EC O157 TSN positivas fue de 47 (2,9%).

La cantidad de MF positivas para STEC O157 es un indicativo de la prevalencia de este grupo patógeno en los animales en pie. En este estudio la prevalencia promedio en MF de STEC O157 fue del 4,1% (33/811). Mientras que la prevalencia en carcasa fue de un 2,6% indicando el grado de contaminación con STEC O157 transferido en el proceso de faena. También se observan los resultados para el grupo EC O157 TSN donde las MF de los animales mostraron una prevalencia del 4,7% (38/811), y la incidencia en carcasa fue del 1,1% (9/811).

Los resultados anteriores se basan en muestras con aislamientos confirmatorios, sin embargo, desde el punto de vista de las metodologías implementadas (Figura 12) es

importante analizar la relación entre muestras presuntivas y confirmadas, mostrado en la Tabla 4 como porcentaje de recuperación.

**Tabla 4:** Cantidad de muestras presuntivas y confirmadas por tipo de muestras y porcentaje de recuperación

GRUPO	RESULTADO	TIPO DE MUESTRA		
	OBTENIDO	CA (N°)	MF (N°)	TOTAL(N°)
EC O157 TSN	Presuntivas	16	78	94
	Confirmadas	9	38	47
	<i>% Recuperación</i>	<i>56,25</i>	<i>48,72</i>	<i>50,00</i>
STEC O157	Presuntivas	25	43	68
	Confirmadas	21	33	54
	<i>% Recuperación</i>	<i>84,00</i>	<i>76,74</i>	<i>79,41</i>

La relación entre las muestras presuntivas y confirmadas, indica la capacidad de recuperar una cepa con la metodología empleada a partir de las muestras con señal PCR positiva en la zona de confluencia (Tabla 4). El grado de recuperación para las STEC O157 fue de casi un 80%, mientras que para el grupo EC O157 TSN fue del 50% en total. Este grado de recuperación puede depender de varios factores, entre ellos, de la cantidad o concentración inicial del microorganismo, del número de colonias analizadas, y de la composición y proporción de la flora acompañante. Estos últimos factores podrían explicar la mayor facilidad de aislamiento a partir de las muestras de carcasas ya que la flora acompañante es menor en este tipo de muestras que en las de materia fecal (Tabla 4).

Por otra parte, la recuperación del grupo EC O157 TSN fue menor en comparación con el grupo STEC O157, muy probablemente debido a que las colonias de STEC O157 son más fácilmente diferenciables en los medios selectivos y diferenciales utilizados (CT-SMAC y ID-O157) por sus características de ser generalmente Sor y  $\beta$ -glu negativas. Otro factor que podría haber disminuido la recuperación de cepas EC O157 TSN, es la probabilidad de que

hubiera también una cepa EC O157 TSN en muestras con zonas de confluencia  $rfb_{O157}^+/stx^+$  donde sólo se intentaron recuperar las STEC O157.

#### 4.1.2. Caracterización de las muestras

Las características y el origen de las muestras (frigorífico muestreado, tipo de animal, procedencia, entre otros) fueron consignados en la planilla acompañante con información que *a priori* pudieran ser importantes para el estudio de prevalencia (Anexo2). El muestreo se realizó de manera que fuera representativo del tipo de hacienda comercializada por los frigoríficos participantes y no estuvo definido por tipo de animal, raza, procedencia, alimentación u otros factores. El tipo de animal muestreado se caracterizó de acuerdo con el peso, la dentición y el sexo informados en dicha planilla y se pudieron clasificar en cinco tipos: Novillos, Vacas, Novillitos, Vaquillonas y Terneros. En base a esto se pudo observar que de los 811 animales muestreados, la mayoría fueron Novillos (46%, 373 animales) y Vacas (24%, 198 animales), seguidos en cantidades descendentes por Novillitos (17%, 136), Vaquillonas (7%, 57) y una baja cantidad de Terneros (casi el 6% muestreado, 47 animales). En la Tabla 5, además del tipo de animal muestreado se puede observar la raza y el peso promedio de la media res. Dentro de la caracterización de la hacienda muestreada podemos ver que la raza predominante fue la europea y en cuanto a la tipificación, la misma presenta un componente mayoritario de animales de mayor peso (novillos) y esto es una consecuencia del tipo de establecimiento participante que en general fueron frigoríficos productores de cortes vacunos de exportación.

**Tabla 5:** Caracterización de la hacienda faenada de acuerdo al tipo de animal y raza

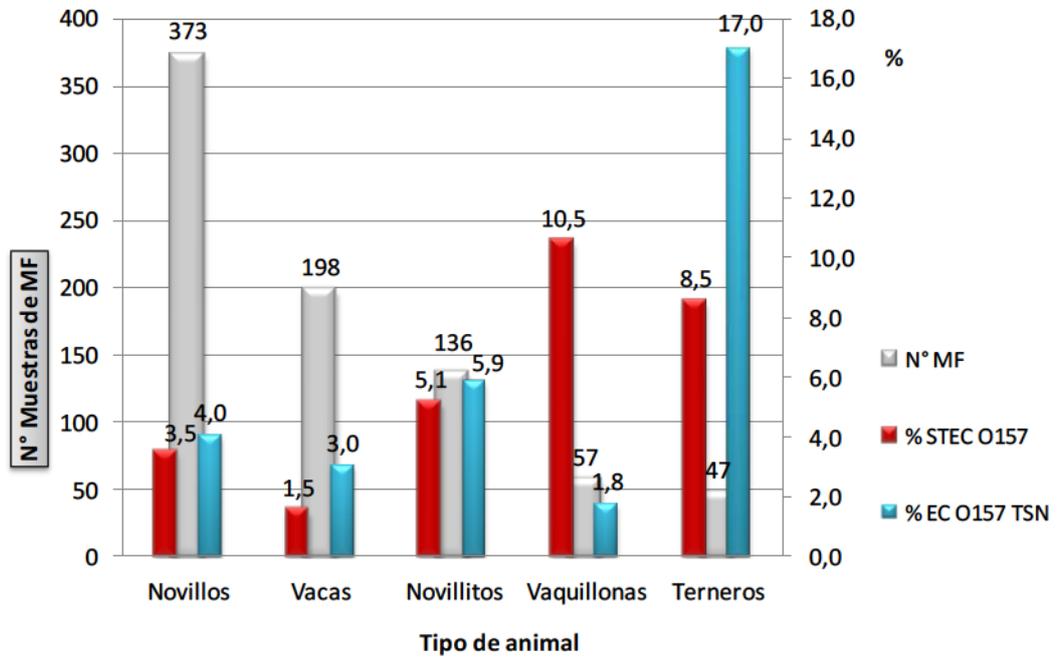
<b>Clasificación</b>	<b>Raza</b>	<b>N</b>	<b>Peso Promedio Media Res</b>
Novillos	Cruza	126	<b>141</b>
	Europeo	241	
	NR*	6	
	<b>Subtotal</b>	<b>373</b>	
Vacas	Continental	34	<b>107</b>
	Cruza	18	
	Europeo	128	
	NR	18	
	<b>Subtotal</b>	<b>198</b>	
Novillitos	Cruza	20	<b>109</b>
	Europeo	110	
	NR	6	
	<b>Subtotal</b>	<b>136</b>	
Vaquillonas	Continental	1	<b>88</b>
	Cruza	6	
	Europeo	50	
	<b>Subtotal</b>	<b>57</b>	
Terneros	Continental	4	<b>73</b>
	Cruza	4	
	Europeo	39	
	<b>Subtotal</b>	<b>47</b>	
<b>Total general</b>		<b>811</b>	

\*NR: no registrado.

Los Terneros y Vaquillonas fueron la clase de animales menos muestreada, sin embargo presentaron porcentajes de prevalencia de STEC O157 más altos en MF (8,5% y 10,5%, respectivamente) y en las canales (3,5 y 8,5, respectivamente) que los animales más pesados y de mayor edad (Figura 14). Si bien es conocida la mayor contaminación con STEC que se da en general con animales de menor edad (Meichtri y col., 2004), este comportamiento también se observó en la portación de EC O157 TSN, donde los Terneros presentaban un alto porcentaje de este grupo (17%, 8/47) en MF. Esta distribución no siempre se ve reflejada en la portación de este serotipo al final de la línea de faena en las carcasas (dato no mostrado)

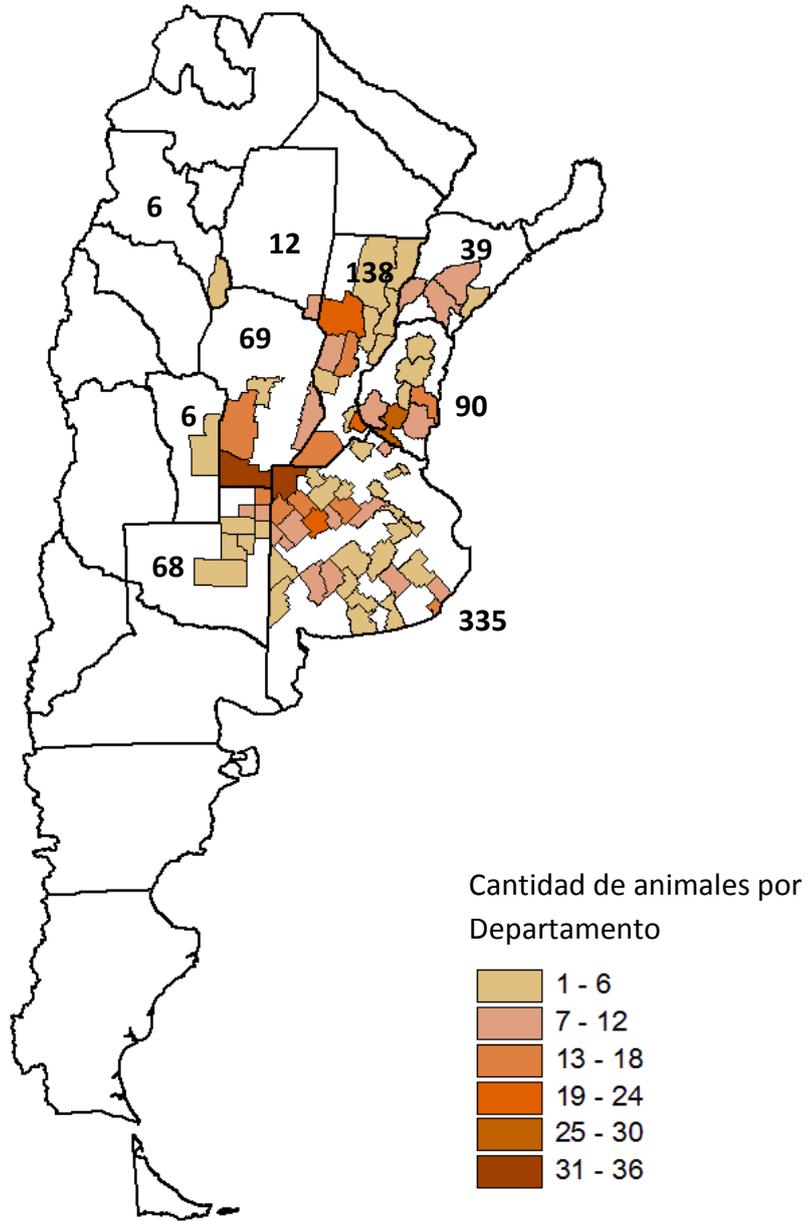
porque el nivel de contaminación de las CA se encuentra influenciado por otros factores ajenos al tipo de animal.

**Figura 14:** Distribución de las STEC O157 y EC O157 TSN de acuerdo al tipo de animal muestreado



La hacienda provino de 9 provincias distintas y del mercado concentrador de Liniers (Figura 15), estando representadas preponderantemente las provincias de mayor relevancia en la producción ganadera de nuestro país, tal que de la Provincia de Buenos Aires provino el 41% (335/811) de los animales muestreados.

**Figura 15:** Mapa de localización geográfica de los departamentos de origen de la hacienda



(48 animales provenían del Mercado concentrador de Liniers).

Con respecto a la distribución geográfica de la prevalencia, encontramos que Provincias de donde provinieron relativamente pocos animales, presentaban un alto nivel de contaminación en la MF de los mismos (Figura 16), tales como Corrientes, Santiago del Estero y Entre Ríos. Por otra parte, siendo Buenos Aires la provincia de origen de la mayor



#### 4.1.3. Influencia del establecimiento muestreado

De acuerdo con los datos del SENASA, en 2005 los frigoríficos participantes en este trabajo fueron responsables de aproximadamente un 18% del total de 12 millones de cabeza faenadas anualmente en el país, estando 6 de los 9 frigoríficos seleccionados entre los 10 primeros en volumen de faena anual. En este trabajo, los 9 establecimientos participantes fueron consignados con letras mayúsculas de imprenta, desde la A hasta la I, respetando el compromiso de confidencialidad y con el fin de evitar subjetividades al momento de analizar los resultados.

En el esquema de muestreo, cada frigorífico participante contribuyó de manera aproximada con el mismo número de muestras, ya que en promedio se muestrearon 90 animales por frigorífico, como se observa en la tabla 6. Sin embargo, dependiendo del establecimiento, la contaminación con STEC O157 en carcasa varía entre 0 y 11%, mientras que en MF se encuentra desde 1,1 a 9,5% y el nivel de EC O157 TSN oscila entre 0-4,8% para CA y entre 0-11% en MF. En general, con respecto a la prevalencia de STEC O157 en la línea de faena de los frigoríficos, observamos que el nivel de contaminación en la entrada (MF) disminuye durante el procesamiento hasta obtener carcasas con porcentaje más bajos (o cero), salvo en el caso de tres establecimientos, el A, el G y el I, donde el porcentaje de incidencia en carcasa aumentó.

Con respecto al grupo no productor de toxina Shiga (EC O157 TSN) vemos que en la mayoría (6/9) de los frigoríficos, en las carcasas muestreadas no se aisló ninguna cepa de este grupo. Solamente en el establecimiento C, aumentó el porcentaje de prevalencia, de no tener presencia en la MF de los animales muestreados, hasta un 3,3% en las muestras de CA. Sin embargo, los resultados obtenidos para el grupo EC O157 TSN están influenciados por la

dificultad de recuperación de cepas EC O157 TSN aisladas (56%, Tabla 4), como ya se mencionó anteriormente.

**Tabla 6:** Distribución de Prevalencia de *E. coli* O157, STEC O157 y EC O157 TSN en MF y CA, de acuerdo al frigorífico muestreado

<b>Frigorífico</b>	<b>Tipo de animal predominante faenado (%*)</b>	<b>Tipo de Muestra</b>	<b>N° Analizadas</b>	<b>N° (%) Muestras <i>E. coli</i> O157 positivas</b>	<b>N° (%) Muestras STEC O157 positivas</b>	<b>N° (%) Muestras EC O157 TSN positivas</b>
A	Vacas (46)	CA	90	2 (2,2)	2 (2,2)	0
		MF	90	1 (1,1)	1 (1,1)	0
B	Novillos (61)	CA	108	0	0	0
		MF	108	12 (11,1)	5 (4,6)	7 (6,5)
C	Novillos (93)	CA	90	3 (3,3)	0	3 (3,3)
		MF	90	2 (2,2)	2 (2,2)	0
D	Vacas (43)	CA	84	1(1,2)	1(1,2)	0
		MF	84	8 (9,5)	2 (2,4)	6 (7,1)
E	Novillos (60)	CA	84	1(1,2)	1(1,2)	0
		MF	84	8 (9,5)	8 (9,5)	0
F	Novillos (100)	CA	84	0	0	0
		MF	84	5 (6)	2 (2,4)	3 (3,6)
G	Terneros (36)	CA	90	10 (11,1)	10 (11,1)	0
		MF	90	16 (17,8)	6 (6,7)	10 (11,1)
H	Novillos (48)	CA	97	3 (3,1)	1 (1)	2 (2,1)
		MF	97	12 (12,4)	4 (4,1)	8 (8,3)
I	Vacas (86)	CA	84	8 (9,5)	6 (7,1)	4 (4,8)
		MF	84	7 (8,3)	3 (3,6)	4 (4,8)
<b>Total</b>			<b>1622</b>	<b>99 (6,1)</b>	<b>54 (3,3)</b>	<b>47 (2,9)</b>

\*% calculado como cantidad de animales faenados del tipo predominante sobre el total de animales faenados en cada establecimiento, por cien.

#### 4.1.4. Distribución por lotes y por animal

Se observó que en la mayoría de los lotes (85,3%) no se detectaron animales positivos para STEC O157 (0/6 MF) y en el 86% de los lotes tampoco se obtuvieron animales positivos para EC O157 TSN, pero en algunas tropas particulares la contaminación fue alta, 4 ó 5 de los 6 animales muestreados (Tabla 7).

**Tabla 7:** Distribución del nivel de contaminación de los lotes como número de animales con MF positivas de seis bovinos analizados

<b>Grado de contaminación en el Lote*</b>	<b>STEC O157 en MF (% de lotes)</b>	<b>EC O157 TSN en MF (% de lotes)</b>
0/6	116 (85,3)	117 (86,0)
1/6	14 (10,3)	9 (6,6)
2/6	2 (1,5)	5 (3,7)
3/6	2 (1,5)	2 (1,5)
4/6	1 (0,7)	2 (1,5)
5/6	1 (0,7)	1 (0,7)
6/6	0 (0)	0 (0)
<b>Total de Lotes</b>		<b>136</b>

\*Animales positivos/animales analizados

Por otra parte, es significativo observar las distintas relaciones entre el nivel de contaminación con STEC O157 a la entrada (MF) y a la salida (CA) de los lotes muestreados (Tabla 8). Además de que un 85% (116/136) de los lotes presentaron MF negativas (0/6 MF), un 90% (122/136 lotes) dieron negativas las 6 muestras de CA (0/6 CA). Es decir que el 15% (20/136) de los lotes tuvieron alguna MF STEC O157 positiva y el 10% (14/136) tuvieron al menos 1 CA positiva, y 7 de los 136 los lotes fue positiva la MF y la CA de alguno de los 6 animales de muestra, es decir que solamente el 5% de los lotes estuvieron contaminados con STEC O157 a la entrada y la salida del procesamiento.

Con respecto a la contaminación de los lotes con EC O157 TSN, si bien se encontraron algunos lotes contaminados a la salida de la faena (CA), se desconoce la relevancia para la salud de este grupo. Por otra parte, su recuperación a partir de muestras presuntivas con *E.*

*coli* O157 es dudosa, ya que la metodología empleada estaba destinada primordialmente a la recuperación de *E. coli* O157:H7 típica.

**Tabla 8:** Relaciones entre lotes positivos para STEC O157 y EC O157 TSN a la entrada (MF) y a la salida (CA) de la faena

Grupo	% Lotes MF-/CA-*	% Lotes MF+/CA-*	N° Lotes MF+/CA+*	N° Lotes MF-/CA+*
STEC O157	80,2	9,6	5,2	5,2
EC O157 TSN	81,6	14,0	0	4,4

\*lote negativo (-), ninguna de las 6 muestras del lote fue positiva, y lote positivo (+), en alguna de las 6 muestras del lote se confirmó la presencia de STEC O157 ó EC O157 TSN.

Si de la misma manera analizamos la contaminación por STEC O157 de los animales al ingreso (MF) y al final (CA) , tenemos como resultado la tabla 9 que nos muestra que del total de animales portadores de STEC O157 en MF (33), aproximadamente un 12% (4/33) presentaron también contaminación en su carcasa por STEC O157. Por otra parte se observó que aproximadamente 2% (17/778) de los animales negativos para la portación de STEC O157 en MF mostraron, sin embargo, contaminación en sus carcasas, siendo este valor el nivel de contaminación cruzada producido por el proceso de faena.

**Tabla 9:** Relaciones entre MF y CA positivas para STEC O157 de los animales muestreados

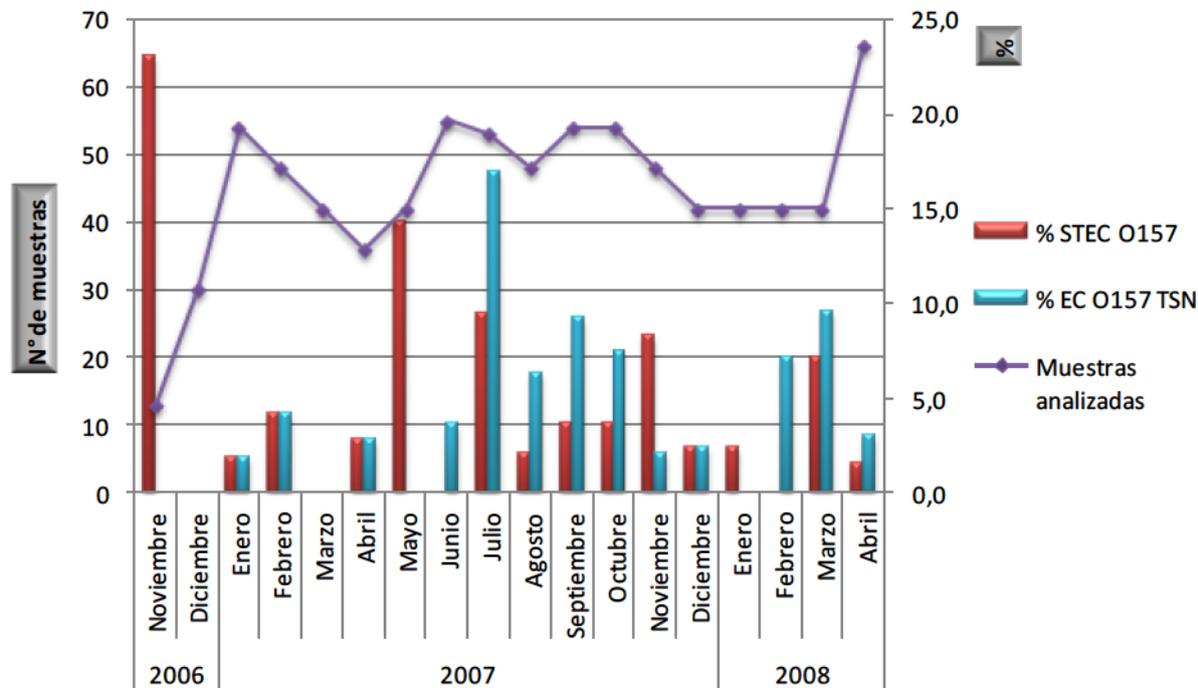
Bovinos Total	N° Bovinos MF-/CA- (%)	N° Bovinos MF+/CA- (%)	N° Bovinos MF-/CA+ (%)	N° Bovinos MF+/CA+ (%)
811	761 (93,8)	29 (3,6)	17 (2,1)	4 (0,5)

#### 4.1.5. Estacionalidad

Analizando los resultados mensuales, se detectaron muestras presuntivas con *E. coli* O157, sean STEC O157 ó EC O157 TSN, en todos los meses del estudio (dato no mostrado), sin embargo, no hubo animales con muestras de MF confirmadas para STEC O157 en los meses de Diciembre de 2006, Marzo y Junio de 2007 y Febrero de 2008 (Figura 17). En los

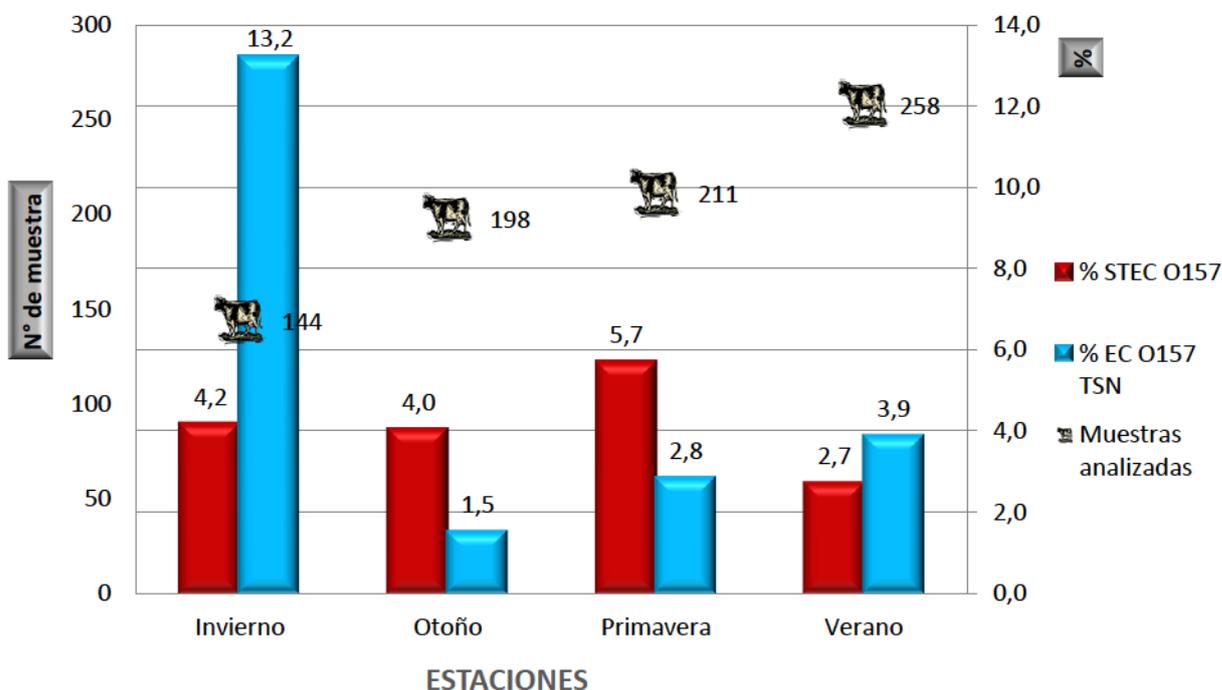
meses de noviembre y diciembre de 2006; marzo y mayo de 2007; y enero de 2008, tampoco hubo recuperación de EC O157 TSN (Figura 17).

**Figura 17:** Evolución mensual de la contaminación de los animales (MF)



Se analizó la distribución estacional de la contaminación de los animales y observamos que la prevalencia de STEC O157 fue de un 4,2% en invierno, 4,0% en otoño, del 5,7% en primavera y 2,7% en verano (Figura 18). Si bien en este estudio se observó una prevalencia mayor de STEC O157 en primavera, estos resultados no son concluyentes ya que para poder hacer una comparación estacional estadísticamente significativa, el número de animales muestreados por estación debería ser mayor y homogéneo.

En el caso de las EC O157 TSN se observa un mayor aislamiento en la estación invernal (13,2%) (Figura 18). Por otro lado, la prevalencia en las canales por estación, se mantuvo relativamente igual en este estudio (dato no mostrado).

**Figura 18:** Evolución estacional de la contaminación de los animales (MF)

#### 4.1.6. Sistema productivo

En cuanto al sistema de producción en que fueron criados los bovinos, la clasificación de los animales como de Estancia, Feedlot y Feria se hizo de acuerdo con la información suministrada por los frigoríficos (Tabla 10).

**Tabla 10:** Muestras analizadas y confirmadas para *E. coli* O157 y STEC O157 discriminadas por tipo de establecimiento de origen

Tipo de Establecimiento	Muestras de MF Analizadas	Muestras <i>E. coli</i> O157 Confirmadas (%)	Muestras STEC O157 Confirmadas (%)
Estancia	624	46 (7,4)	25 (4,0)
Feedlot	60	11 (18,3)	2 (3,3)
Feria	108	10 (9,3)	3 (2,8)
NR*	19	4 (21,1)	3 (15,8)
<b>Total</b>	<b>811</b>	<b>71 (8,8)</b>	<b>33 (4,1)</b>

\*NR: no registrado

La mayoría de los animales (77%) provinieron de estancias, los que fueron alimentados fundamentalmente a pasto y probablemente con terminación a grano. En comparación, fueron

pocos los animales en este estudio que fueron registrados como provenientes de instalaciones de engorde a corral (*feedlots*) (7,4%). En esta comparación no hubo una diferencia significativa de ocurrencia de STEC O157 en heces de animales de estancia (4,0%) y de Feedlot (3,3%).

#### 4.2. Caracterización de los aislamientos de *E. coli* O157 obtenidos para conocer su potencial patogénico y sus características epidemiológicas

De las muestras de materia fecal y carcasa positivas para *E. coli* O157 se aislaron 54 cepas de STEC O157 y 48 cepas EC O157 TSN a las que se les realizaron la caracterización fenotípica y genotípica.

##### 4.2.1. Caracterización fenotípica de los aislamientos

Los resultados globales se observan en la Tabla 11.

**Tabla 11:** Resumen de características fenotípicas de las cepas STEC O157 y EC O157 TSN aisladas

Característica fenotípica	STEC N° (%)	EC O157 TSN N° (%)
<b>Sor (-)</b>	54 (100)	1*(2,1)
<b>β-glu (-)</b>	54 (100)	1*(2,1)
<b>Biotipo C</b>	52 (96,3)	NC**
<b>EHEC-Hly (+)</b>	40 (74,1)	0 (0)
<b>Citotoxicidad Stx1</b>	9 (16,7)	0 (0)
<b>Citotoxicidad Stx2</b>	54 (100)	0 (0)
<b>Sensibilidad ATB</b>	48 (88,9)	30 (62,5)
<b>Anti-O157 (+)</b>	54 (100)	48 (100)
<b>Anti-H7 (+)</b>	54 (100)	38 (79,2)

\*cepa EC O157 TSN (I-010) \*\*NC: no corresponde

De acuerdo con el Manual de Procedimientos para la detección de *E. coli* O157, la caracterización bioquímica mostró que todas las cepas aisladas pertenecían a la especie *Escherichia coli* y ninguna a *E. hermannii*. Además, todas las STEC O157 fueron Sor (-) y β-glu (-), mientras que las cepas no toxigénicas fueron Sor (+) y β-glu (+), excepto una cepa (I-010).

Según el comportamiento de las *E. coli* O157:H7 frente a los azúcares Dulcitol, Rafinosa y Ramnosa, las cepas productoras de toxina Shiga mostraron que el biotipo C (Dulcitol+/Rafinosa+/ Ramnosa+) fue el biotipo predominante, con sólo 2 cepas del biotipo B (Dulcitol+/Rafinosa+/ Ramnosa-) y no se presentó ninguna cepa de los biotipos A ó D.

En este estudio, el 74% (40/54) de las cepas de STEC O157 fueron fenotípicamente productoras de Enterohemolisina, mientras que las demás STEC O157 (14/54) y las cepas TSN (48/48) no mostraron la hemólisis típica de EHEC-Hly.

Todas las cepas STEC O157 aisladas expresaron toxicidad en células Vero. De las 54 cepas STEC O157, 9 expresaron citotoxicidad para toxina Stx1 y Stx2, mientras que las otras 45 cepas presentaron toxicidad para Stx2 solamente. Las cepas EC O157 TSN, como era esperable, no presentaron citotoxicidad en células Vero.

En los ensayos de sensibilidad a antimicrobianos, 48 (89%) de 54 STEC O157 aislados fueron sensibles (S) a todos los antibióticos probados. Solo dos cepas fueron resistentes (R) a NAL, una a AMP, una a STR, y dos a NAL y TMS. Con respecto a las EC O157 TSN, 30 de 48 (62,5%) cepas fueron susceptibles a todos los antibióticos, 11 R (22,9%) a un antibiótico y 7 R (14,6%) a más de un antibiótico (Tabla 12).

**Tabla 12:** Susceptibilidad a antibiótico (Atb) de las cepas de *E. coli* O157

Tipo de <i>E. coli</i> O157	Susceptibilidad a Antibióticos		
	S	R (1 Atb)	R (+1 Atb)
STEC O157	48	4	2
EC O157 TSN	30	11	7

Se corroboró por aglutinación con antisuero policlonal anti-O que todos los aislamientos (STEC O157 y EC O157 TSN) son del serotipo O157 y también se demostró la motilidad flagelar H7 por aglutinación de todas las STEC y de 38 cepas EC O157 TSN. Las 10 cepas EC O157 TSN restantes fueron no tipificables en su antígeno flagelar H.

#### 4.2.2. Virulencia de las cepas aisladas

Todas las cepas de *E. coli* O157, confirmadas por sus características fenotípicas, se analizaron por la presencia de los genes *stx*<sub>1</sub>, *stx*<sub>2</sub> y *rfb*<sub>O157</sub> por PCR múltiple. La

caracterización de la virulencia de las cepas se completó con la determinación, por PCR, de la presencia de los genes de otros factores de virulencia asociados a STEC. Estos fueron: el gen para el antígeno flagelar H7 (*fliC<sub>H7</sub>*), el gen para enterohemolisina (*ehxA*), para la intimina (*eae*), y para la adhesina aglutinante de STEC (*saa*). También se analizaron las variantes genéticas de la toxina Shiga presentes en cada cepa de STEC O157 por PCR-RFLP (Tabla 13).

Todos los aislamientos de STEC O157 (54 cepas) albergaban los genes *stx<sub>2</sub>*, *eae*, *ehxA*, y *fliC<sub>H7</sub>*, mientras que el gen *stx<sub>1</sub>* estuvo presente en el 16,7% (9/54) de las cepas. El genotipo de toxina Shiga prevalente fue el *stx<sub>2</sub>/stx<sub>2c</sub>* (vh-a) 56% (30/54), seguida de la variante *stx<sub>2c</sub>* (vh-a) (17%) (Tabla 13). Ninguna de estas cepas, STEC O157 y EC O157 TSN mostró la presencia del gen *saa*.

**Tabla 13:** Genotipos de virulencia de las cepas aisladas de materia fecal (MF) y carcasas (CA)

Genotipo de virulencia	MF (N°)	CA (N°)	Total N° (%)
<i>eae-ehxA-fliC<sub>H7</sub>-stx<sub>2</sub>/stx<sub>2c</sub></i> (vh-a)	19	11	30 (56)
<i>eae-ehxA-fliC<sub>H7</sub>-stx<sub>2c</sub></i> (vh-a)	6	3	9 (17)
<i>eae-ehxA-fliC<sub>H7</sub>-stx<sub>2</sub></i>	1	4	5 (9)
<i>eae-ehxA-fliC<sub>H7</sub>-stx<sub>1</sub>/stx<sub>2</sub>/stx<sub>2c</sub></i> (vh-a)	3	1	4 (7)
<i>eae-ehxA-fliC<sub>H7</sub>-stx<sub>1</sub>/stx<sub>2</sub></i>	3	1	4 (7)
<i>eae-ehxA-fliC<sub>H7</sub>-stx<sub>1</sub>/stx<sub>2c</sub></i> (vh-a)	1	0	1 (2)
<i>eae-ehxA-fliC<sub>H7</sub>-stx<sub>2</sub></i> ND*	0	1	1 (2)
<i>eae-ehxA-fliC<sub>H7</sub></i>	0	1**	--
<b>Total</b>	<b>33</b>	<b>22</b>	<b>54 (100)</b>

\*ND: variante de *Stx<sub>2</sub>* no determinada \*\* cepa EC O157 TSN (I-010)

Aunque algunas cepas EC O157 TSN poseían el gen *fliC<sub>H7</sub>* (10/48), las mismas no presentaron de los genes de virulencia asociados *eae*, *ehxA*, con excepción de una cepa denominada en el laboratorio como I-010 que poseía los genes *eae*, *ehxA* y *fliC<sub>H7</sub>* pero que carecía de los genes *stx* (Tabla 13). La misma podría considerarse como una cepa patógena que probablemente perdió el fago toxigénico mediante una transferencia horizontal.

#### 4.2.3. Subtipificación de los aislamientos

La relación clonal de las cepas de STEC O157 y de EC O157 TSN fue establecida por los perfiles de PFGE del ADN genómico después de la digestión con *XbaI* como primera enzima y *BlnI* como segunda enzima. En el caso de las cepas STEC O157 la subtipificación se completó por la fagotipificación.

Los 54 aislamientos de STEC O157 fueron clasificados en 12 fagotipos (PT) diferentes. La frecuencia de PT fue de un 25,9% PT2; 16,7% PT39; un 11,1% PT4 y PT49; 7,4% PT21; un 5,6% PT26 y PT33, un 3,7% PT8 y PT43; un 1,9% PT10, PT31, PT51; mientras que el 3,7% de las cepas fueron no tipificables por fagos.

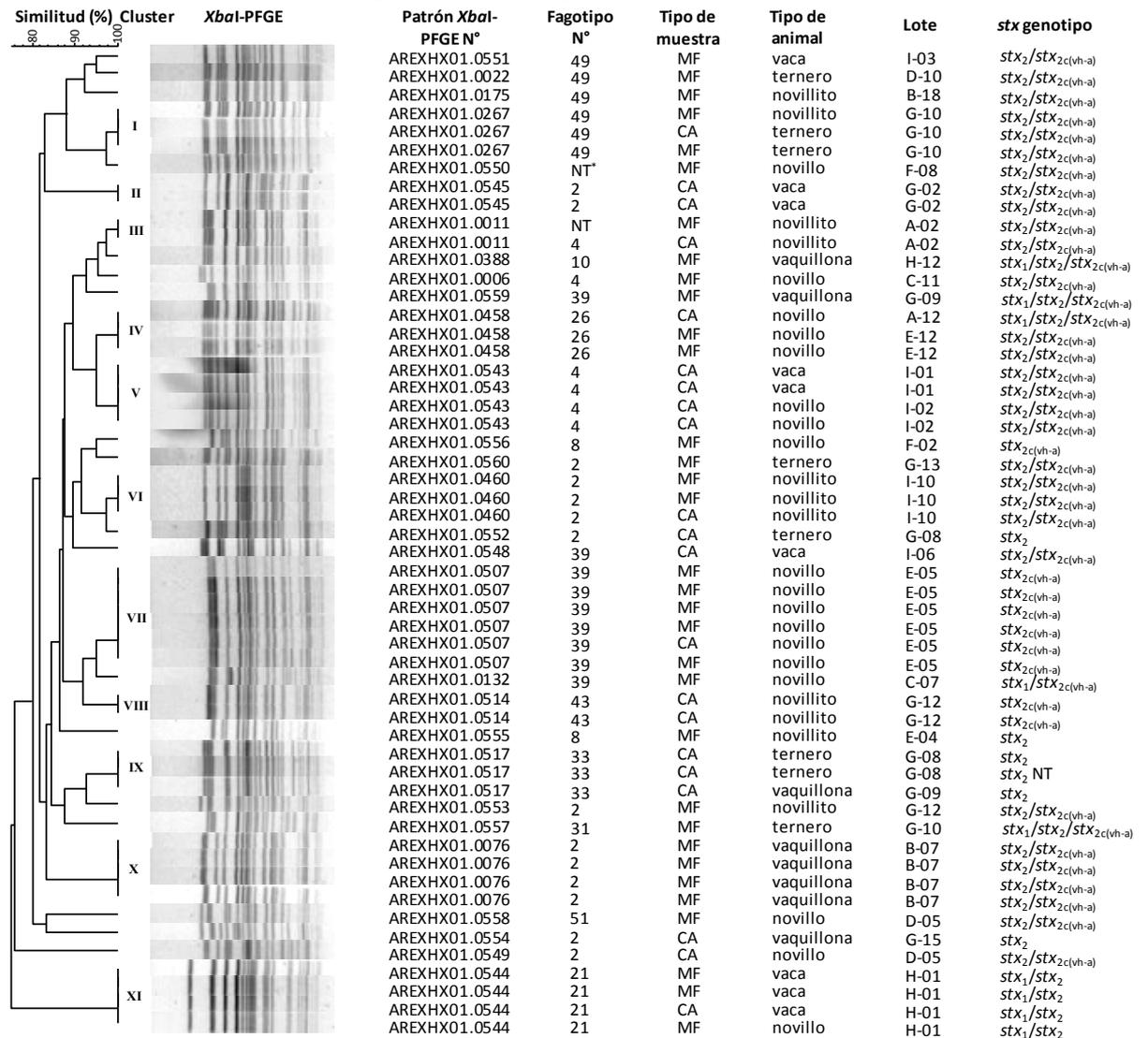
Por *XbaI*-PFGE, los STEC O157 aislados generan 29 patrones diferentes con al menos 75% de similitud (Figura 19). Treinta y seis cepas fueron agrupadas en 11 *clusters*, mientras que las 18 cepas restantes mostraron patrones de restricción únicos. En los grupos o *clusters* se consideraron a las cepas que presentaron perfiles de PFGE con un 100% de similitud, es decir con idéntico patrón de cantidad y distribución de bandas de ADN.

Recordamos que cada lote se consignó con la letra del frigorífico visitado y el número de visita correspondiente, y que en cada visita se muestrean 6 animales pertenecientes en general a una misma tropa. Para STEC O157, los 29 patrones *XbaI*-PFGE se distribuyeron en 27 lotes contaminados. En la mayoría de los lotes (81% - 22/27), solo un patrón *XbaI*-PFGE fue identificado (Figura 19).

Los clusters se nombraron con números romanos consecutivos (número de cepas, número de fagotipo y número de patrón de *XbaI*-PFGE) y fueron los siguientes: I (3 cepas, PT49, AREXHX01.0267), II (2 cepas, PT2, AREXHX01.0545), III (2 cepas, PT4 y NT, AREXHX01.0011), IV (3 cepas, PT26, AREXHX01.0458), V (4 cepas, PT4, AREXHX01.0543), VI (3 cepas, PT2, AREXHX01.0460), VII (6 cepas, PT39,

AREXHX01.0507), VIII (2 cepas, PT43, AREXHX01.0514), IX (3 cepas, PT33, AREXHX01.0517), X (4 cepas, PT2, AREXHX01.0076), y XI (4 cepas, PT21, AREXHX01.0544) y se puede observar el dendrograma (Figura 19).

**Figura 19:** Dendrograma de las cepas STEC O157 por *XbaI*-PFGE



\*NT: no tipificable

Si bien los clusters presentan 100% de similitud genética entre las cepas que contienen, en algunos casos las cepas presentan diferencias con respecto al origen de las muestras de donde fueron aisladas. Por ejemplo, el cluster I, VI y XI, contenían cepas idénticas por subtificación, la mayoría provenían de MF, excepto una cepa en cada cluster que se aisló después del procesamiento en CA. Las cepas del cluster III se distinguían en su fagotipo y

también provenían de diferentes tipos de muestras. Una cepa del cluster IV fue diferente del resto por *BlnI*-PFGE (imagen no mostrada) y por su genotipo toxigénico. Esta cepa además de pertenecer a diferente tipo de muestra (CA), provenía de un lote de muestreo distinto y de un frigorífico diferente (A-12) al de las otras dos cepas perteneciente a este grupo (E-12). En el cluster V, dos de las cuatro cepas de este grupo se aislaron de un lote consecutivo al de las otras, en el mismo establecimiento (I-01 y I-02). El grupo VII contiene 6 cepas idénticas de las cuales 5 provinieron de MF y una sola de CA. Una cepa (1/3) del cluster IX fue distinta en su genotipo toxigénico ya que presentó el gen *stx<sub>2</sub>* en una variante no tipificable (NT) y además las 3 cepas de este grupo fueron aisladas de lotes consecutivos (G-08 y G-09), como en el caso del cluster V.

Se observó que las STEC O157 agrupadas en 11 clusters de *XbaI*-PFGE derivaban de 14 lotes diferentes (Tabla 14), independientemente de si provenían de la MF o la CA de los animales. Las cepas que provenían de las muestras fecales se agruparon en 7 clusters, mientras que las 17 cepas aisladas de carcasa se agruparon en 9 clusters. El mismo patrón de *XbaI*-PFGE fue identificado en las muestras de heces y carcasa en 5 lotes (G10, A2, I10, E5 y H1). En el caso de los clusters *XbaI*-PFGE V y IX, las cepas provenían de más de un lote; en ambos casos los aislamientos se obtuvieron de las canales de un mismo establecimiento y de visitas consecutivas (Tabla 14) con una diferencia temporal entre ellas de casi un mes. Las fechas de las visitas al frigorífico I fueron: I-01, 18/12/06; I-02, 24/01/07 y las visitas al frigorífico G fueron: G-08, 04/09/07; G-09, 24/09/07.

**Tabla 14:** Descripción de las características de los clusters de STEC O157

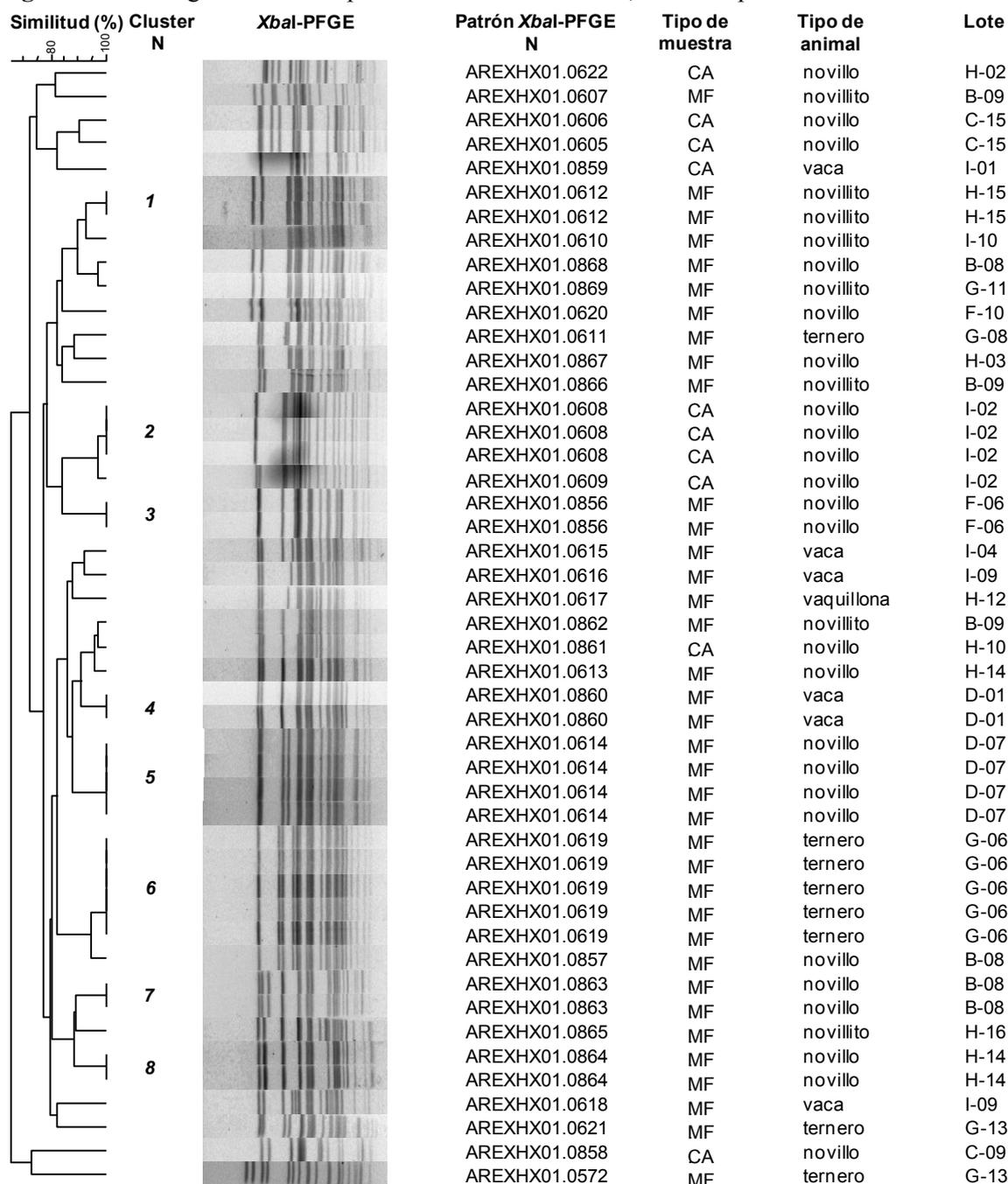
Cluster <i>Xba</i> I-PFGE	PT	<i>stx</i> genotipo	Lote	MF (N°)	CA (N°)
I	49	<i>stx</i> <sub>2</sub> / <i>stx</i> <sub>2c(vh-a)</sub>	G-10	2	1
II	2	<i>stx</i> <sub>2</sub> / <i>stx</i> <sub>2c(vh-a)</sub>	G-02	<	2
III	NT	<i>stx</i> <sub>2</sub> / <i>stx</i> <sub>2c(vh-a)</sub>	A-02	1	-
III	4	<i>stx</i> <sub>2</sub> / <i>stx</i> <sub>2c(vh-a)</sub>	A-02	-	1
IV	26	<i>stx</i> <sub>1</sub> / <i>stx</i> <sub>2</sub> / <i>stx</i> <sub>2c(vh-a)</sub>	A-12	-	1
IV	26	<i>stx</i> <sub>2</sub> / <i>stx</i> <sub>2c(vh-a)</sub>	E-12	2	-
V	4	<i>stx</i> <sub>2</sub> / <i>stx</i> <sub>2c(vh-a)</sub>	I-01	-	2
V	4	<i>stx</i> <sub>2</sub> / <i>stx</i> <sub>2c(vh-a)</sub>	I-02	-	2
VI	2	<i>stx</i> <sub>2</sub> / <i>stx</i> <sub>2c(vh-a)</sub>	I-10	2	1
VII	39	<i>stx</i> <sub>2c(vh-a)</sub>	E-05	5	1
VIII	43	<i>stx</i> <sub>2c(vh-a)</sub>	G-12	-	2
IX	33	<i>stx</i> <sub>2</sub>	G-08	-	1
IX	33	<i>stx</i> <sub>2</sub> ND	G-08	-	1
IX	33	<i>stx</i> <sub>2</sub>	G-09	-	1
X	2	<i>stx</i> <sub>2</sub> / <i>stx</i> <sub>2c(vh-a)</sub>	B-07	4	-
XI	21	<i>stx</i> <sub>1</sub> / <i>stx</i> <sub>2</sub>	H-01	3	1
<b>Total</b>				<b>19</b>	<b>17</b>

Por otra parte, también se encontraron aislamientos con patrones diferentes en un mismo lote, tal es el caso de los patrones AREXHX01.0552 (1 cepa) y AREXHX01.0517 (2/3 cepas) aislados del lote G-08; el AREXHX01.0559 (1 cepa) y AREXHX01.0517 (1/3 cepas) del lote G-09; el AREXHX01.0267 (3/3 cepas) y el AREXHX01.0557 (1 cepa) del lote G-10; el AREXHX01.0514 (2/2 cepas) y el AREXHX01.0553 (1 cepa) del lote G-12, y por último los patrones AREXHX01.0558 (1 cepa) y AREXHX01.0549 (1 cepa) aislados del mismo lote D-05 (Figura 19).

También se realizó el análisis filogenético de las *E. coli* O157 no toxigénicas y de las 48 cepas EC O157 TSN, una de ellas no se pudo analizar por PFGE porque su ADN se lisó reiteradamente durante la preparación de los plugs. Las 47 restantes generaron 34 patrones de

*Xba*I-PFGE diferentes con más de un 64,78% de similitud entre ellas. Algunos patrones se agruparon en 8 clusters con 100% de similitud en la restricción con la enzima *Xba*I (Figura 20) y también con la segunda enzima *Bln*I (dato no mostrado).

**Figura 20:** Dendograma de las cepas EC O157 TSN aisladas, obtenido por *Xba*I-PFGE



Los clusters se nombraron con números arábigos consecutivos y fueron los siguientes: **1** (2 cepas, AREXHX01.0612), **2** (3 cepas, AREXHX01.0608), **3** (2 cepas, AREXHX01.0856),

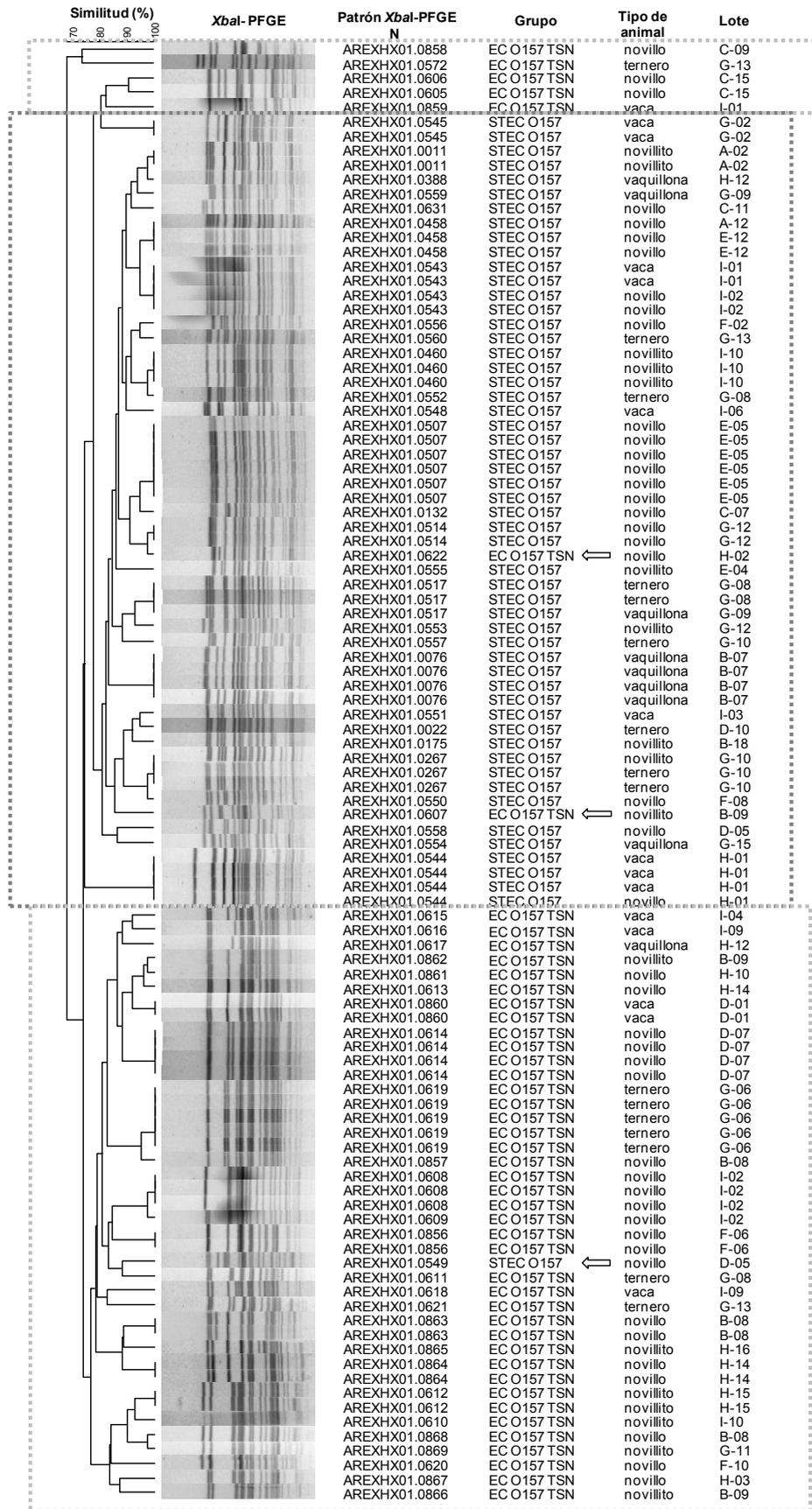
4 (2 cepas, AREXHX01.0860), 5 (4 cepas, AREXHX01.0614), 6 (5 cepas, AREXHX01.0619), 7 (2 cepas, AREXHX01.0863), y 8 (2 cepas, AREXHX01.0864) y se puede observar el dendograma obtenido (Figura 20).

A diferencia de las cepas de STEC, las EC O157 TSN agrupadas en clusters, provenían del mismo origen en relación al lote, al tipo de muestra (CA o MF) y a la clase de bovino muestreado. La mayoría de estas cepas (38/48, 80%), se aislaron a partir de materia fecal. En este contexto, sólo en 1 (número 2) de los 8 clusters obtenidos, 3 cepas agrupadas provenían de carcasa. Una cepa (patrón N° AREXHX01.0609) aislada de una carcasa del mismo lote (I-02) que el cluster 2 se presenta una similitud de 97,5% y una sola banda de diferencia (Figura 20).

Las cepas FP-031 (patrón N° AREXHX01.0608) y FP-032 (AREXHX01.0609), pertenecen al mismo animal muestreado y se diferencian en una sola banda. No pertenecen al mismo cluster por que los definimos por el 100% de similitud pero aparentemente sería una misma cepa en la que ocurrió de un evento genético aislado como por ejemplo una mutación puntual, una delección o una inserción.

Cuando se analiza la relación clonal entre todas las cepas toxigénicas y las no toxigénicas (Figura 21), se observa que tienen aproximadamente un 67,69% de similitud y no se presentan una asociación entre ellas sino que se agrupan de forma separada, como se muestra en el árbol, mostrando un origen genético diferente, con excepción de dos cepas EC O157 TSN (I-010 y I-119) que se encuentran más cercanas por PFGE a las STEC.

Figura 21: Dendrograma de todas las cepas de *E. coli* O157 aisladas (STEC y EC O157 TSN)



La cepa EC O157 TSN I-010 (AREXHX01.0622), como ya se mencionó anteriormente, presenta los genes de virulencia asociados a STEC, pero no contiene genes de ninguna de las toxinas Shiga y además se encuentra más relacionada filogenéticamente al grupo de las STEC que a las EC O157 TSN, asociada con más de un 90% de similitud al cluster VIII de las STEC, aunque no tiene ningún tipo de relación con respecto al origen de la muestra. La cepa EC O157 TSN I-119 (AREXHX01.0607), también se agrupo con las STEC pero no tiene ninguna relación en su caracterización genética o en su origen con este grupo. Por otra parte también encontramos una cepa STEC O157, la denominada a nivel de laboratorio como FP-130 (AREXHX01.0549), que se asocia filogenéticamente con las cepas no toxigénicas (Figura 21).

#### 4.3. Estimación de la respuesta al estrés ácido de los aislamientos obtenidos

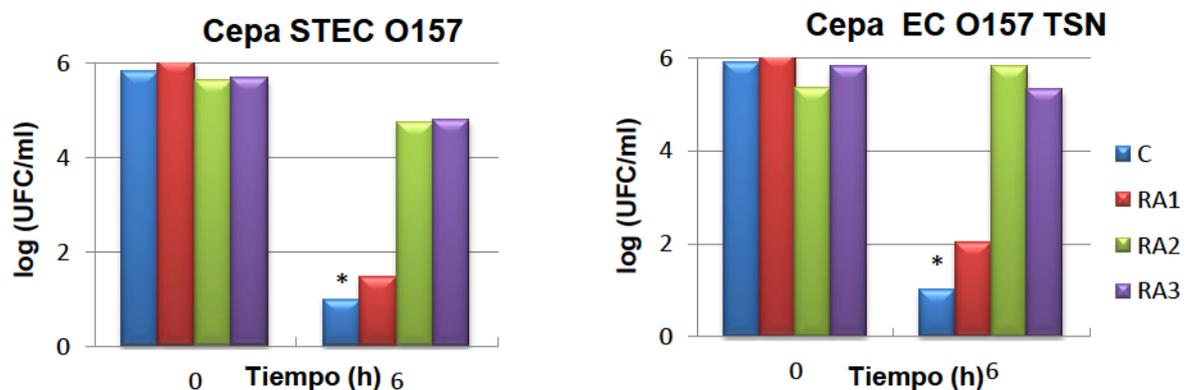
Se determinó la resistencia ácida (RA) de 30 cepas seleccionadas de STEC O157 y 35 cepas EC O157 TSN por duplicado, por los tres mecanismos principales conocidos, RA<sub>1</sub>, RA<sub>2</sub> y RA<sub>3</sub> y conjuntamente se realizó un control (C) de muerte celular como se describe en la Figura 13. Los resultados de los NRL promedios obtenidos para cada cepa de los dos grupos se pueden observar en la tabla 15.

**Tabla 15:** Valores de NRL obtenidos por los diferentes mecanismos de RA ensayados

Nombre de la Cepa STEC O157	Mecanismo de RA				Nombre de la Cepa EC O157 TSN	Mecanismo de RA			
	C	RA1	RA2	RA3		C	RA1	RA2	RA3
	NRL promedio					NRL promedio			
I-014	3,34	2,32	0,04	0,16	I-122	2,93	3,56	-0,09	0,23
FP-210	4,43	1,20	0,12	1,66	FP-037	4,57	2,34	-0,02	0,13
I-037	4,24	2,37	0,15	2,76	FP-157	4,40	1,22	0,10	0,95
FP-172	4,57	1,35	-0,01	0,61	I-100	4,58	1,32	0,12	1,63
FP-168	4,55	3,96	-0,09	4,57	FP-165	2,45	4,08	0,09	2,85
FP-014	4,49	4,07	0,06	3,99	FP-121	3,98	3,09	0,22	4,10
FP-099	4,38	4,58	0,69	3,56	I-111	5,27	3,98	0,56	1,18
FP-225	3,05	4,77	0,63	2,90	I-158	2,13	5,07	0,62	1,92
FP-246	4,75	4,21	1,08	5,24	FP-035	4,81	4,17	0,45	4,23
FP-155	5,23	4,69	0,87	5,30	I-010	4,81	3,71	0,55	4,63
I-106	4,78	4,00	0,40	4,85	I-119	5,21	4,60	0,65	3,61
I-002	5,29	5,01	0,47	3,51	FP-255	5,23	5,44	4,30	4,78
FP-049	4,77	3,99	0,31	1,46	I-118	3,00	5,20	-0,46	1,54
FP-130	5,14	5,13	0,59	2,00	I-133	5,23	4,51	-0,93	3,70
FP-152	5,57	5,58	1,05	3,69	I-165	4,43	4,03	1,07	3,49
I-070	5,23	4,25	0,75	2,45	FP-078	4,17	4,61	1,04	3,91
I-173	5,31	4,60	0,90	0,88	I-146	4,51	5,78	0,09	0,77
FP-196	4,90	4,35	0,70	0,97	FP-164	5,39	4,04	-0,45	0,47
I-144	5,26	5,05	0,94	1,21	I-159	5,27	5,08	-0,51	0,89
FP-148	5,20	5,44	1,07	0,55	I-124	5,43	5,45	-0,35	0,91
FP-160	5,08	4,85	1,87	2,24	FP-211	5,36	4,48	0,93	0,65
FP-161	5,35	5,32	1,77	1,84	I-114	5,31	4,74	1,46	0,39
FP-171	5,06	5,13	0,33	1,83	FP-170	4,80	2,80	0,44	2,06
FP-103	5,14	3,22	0,20	2,18	I-150	5,09	5,25	0,64	2,19
FP-248	5,10	4,61	1,38	1,90	FP-154	5,12	3,61	0,40	1,47
FP-131	5,30	4,90	1,43	3,28	FP-013	4,91	3,35	0,04	3,76
FP-114	4,71	3,37	0,49	3,53	FP-138	5,10	4,00	0,17	2,07
FP-253	5,18	3,36	1,16	2,01	I-012	4,62	3,98	0,32	1,38
FP-028	5,30	5,24	2,63	1,85	I-110	5,06	5,16	-0,08	1,72
FP-206	5,14	4,91	3,00	3,39	I-164	5,29	5,32	0,21	2,50
					I-175	4,46	3,69	0,05	0,68
					I-170	5,24	3,52	0,61	0,83
					FP-252	4,96	3,19	0,14	0,67
					FP-031	5,11	4,22	0,36	1,18
					FP-197	5,03	4,38	0,19	0,61

Todas las cepas al inicio del desafío, tenían un recuento aproximado de 6 ( $\log N_i = 6$ ), a las 6 h del desafío los resultados variaron de acuerdo con el mecanismo de resistencia estudiado. En la mayoría de los casos, los controles de desafío después de las 6 horas de incubación, tuvieron recuentos por debajo del límite de detección ( $\log N_f < 1$ ). Para poder graficar y realizar los cálculos de resistencia ácida cuando los recuentos se encontraban por debajo del límite de detección, se consideró el valor de los mismos como el propio límite de detección, es decir 1 [ $\log (10 \text{ UFC/ml}) = 1$ , por siembra y recuento en espiral]. Resultados típicos de recuentos obtenidos para cada cepa, tanto STEC O157, como EC O157 TSN, se pueden observar en el ejemplo de la figura 22 que representa la RA de dos tipos de cepas por los 3 mecanismos estudiados y el control correspondiente.

**Figura 22:** Ejemplo de recuentos para la respuesta al desafío ácido de una cepa STEC O157 y una EC O157 TSN en los tiempo inicial (0h) y final (6h) por los 3 mecanismos de RA y el Control (C)



\*< Límite de detección (<1).

Para cada réplica se determinó el NRL (número de reducciones logarítmicas) entre 0 y 6 h del ensayo de desafío y se comparó las respuestas al estrés ácido de las cepas de *E. coli* O157. En la tabla 15 se muestran las medias de NRL de acuerdo con el tipo de cepa estudiada (STEC O157 ó EC O157 TSN) y del mecanismos de RA ensayado. El mecanismo de RA2 dependiente de Glutamato fue el más protector contra la acidez del medio, seguido del RA3 y luego el RA1 con valores promedio de NRL más cercanos a los valores del control. En la tabla 16 vemos que comparando cada sistema de RA por la prueba estadística de Kruskal-

Wallis hay diferencias significativas en la resistencia al estrés ácido dependiendo del mecanismo que utilice el microorganismo para defenderse de dicho estrés (letras minúsculas diferentes implican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ )). Tanto en el caso de las cepas de STEC O157, como así también para las EC O157 TSN, pero en este último, grupo la respuesta por el sistema RA1 no se diferencia del control (letras minúsculas iguales). Con lo cual podemos suponer que el mecanismo RA1 no tuvo un efecto protector contra el estrés ácido en las cepas de EC O157 TSN. Por otra parte, si comparamos como es la respuesta de las cepas STEC O157 con las EC O157 TSN para cada mecanismo de RA vemos que, RA2 y RA3 tienen diferencias significativas de acuerdo con la toxicidad de las cepas (letras mayúsculas diferentes,  $p \leq 0,05$ ). Mientras que el sistema RA1 al igual que el C, no presentan diferencias significativas entre la respuesta de las STEC O157 y las EC O157 TSN (letras mayúsculas iguales,  $p > 0,05$ ).

**Tabla 16:** Número de Reducciones Logarítmicas (NRL) promedio para cada sistema de RA y de acuerdo con el tipo de cepa estudiado

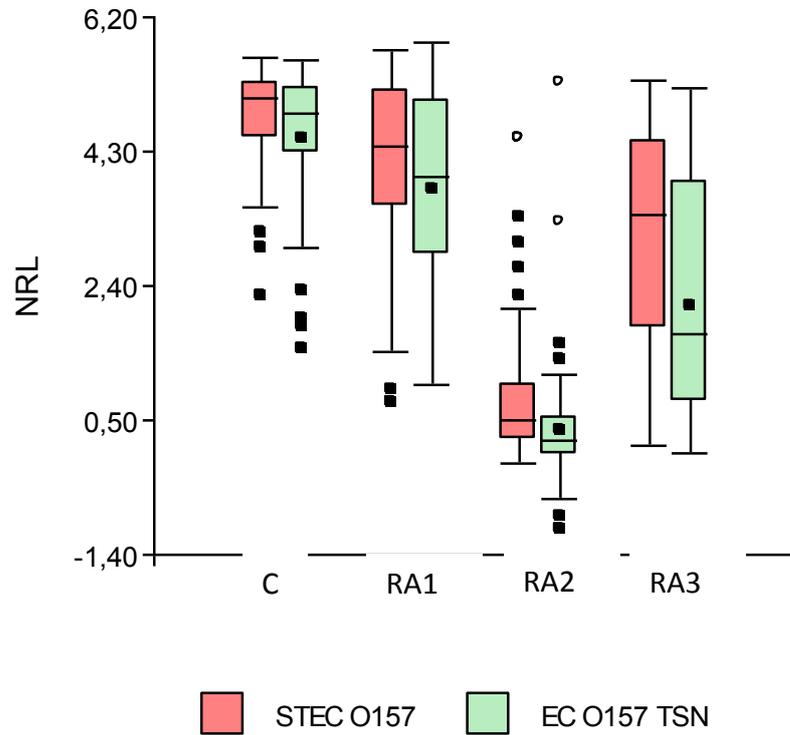
Sistema	NRL media		<i>p</i> (grupo toxicidad)
	STEC O157	EC O157 TSN	
RA2	0,91 <sup>aA**</sup>	0,37 <sup>aB**</sup>	<0,0001
RA3	2,55 <sup>b*A</sup>	1,95 <sup>bB</sup>	0,0130
RA1	4,19 <sup>cA</sup>	4,08 <sup>cA</sup>	0,3876
C	4,87 <sup>dA</sup>	4,64 <sup>cA</sup>	0,3134
<i>p</i> (mecanismo)	<0,0001	<0,0001	

\* una letra minúscula diferente, en una columna, indica diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ).

\*\* una letra mayúscula diferente, en una fila, indica diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ).

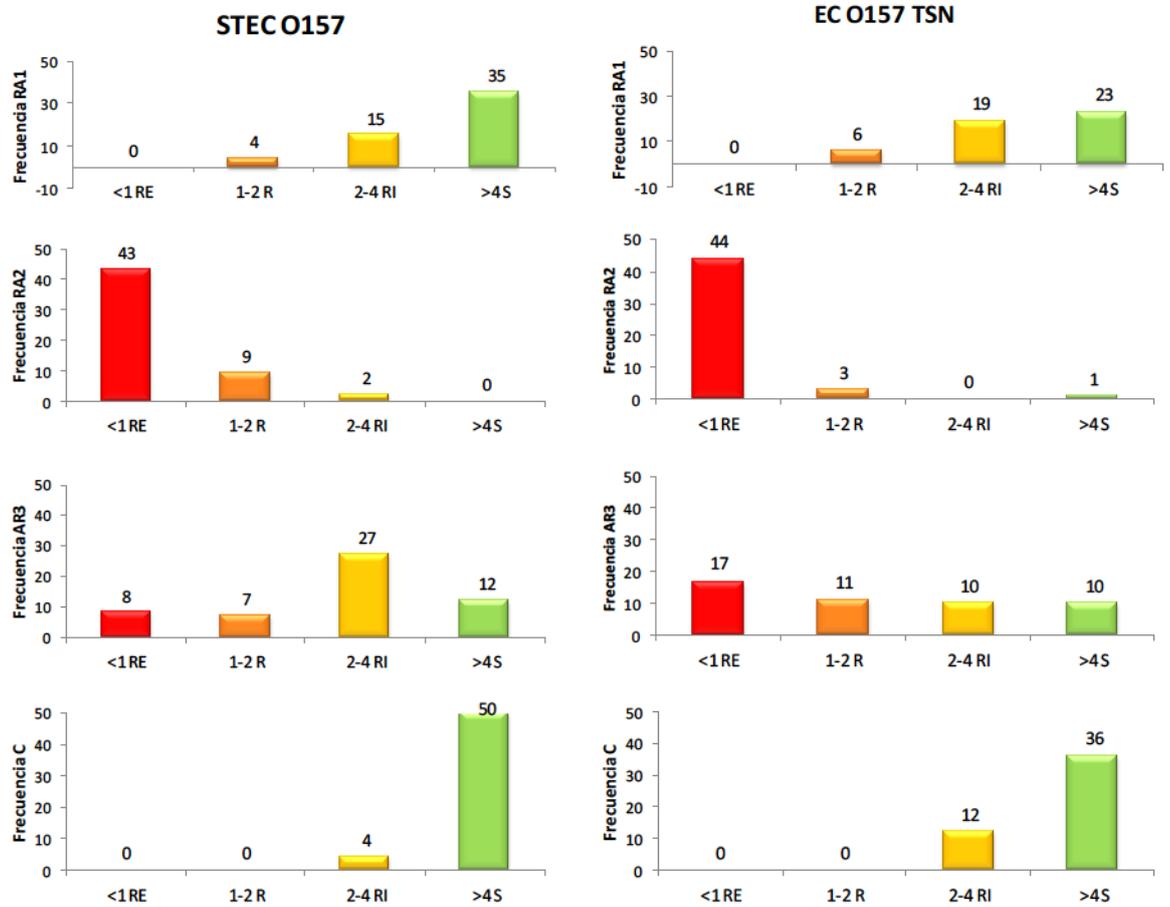
La distribución de NRL de todas las cepas estudiadas por los diferentes mecanismos de RA se observan en el gráfico de BoxPlot (Figura 23).

**Figura 23:** Gráfico de BoxPlot de los NRL de las STEC O157 y EC O157 TSN por mecanismo de RA analizado



La variación de la resistencia ácida de las cepas STEC O157 y las EC O157 TSN se puede analizar a través de gráficos de distribución de frecuencia (Figura 24). Se pueden establecer 4 categorías de respuesta de RA: si NRL es mayor a 4, se consideran cepas sensibles (S); con NRL entre 2 y 4, la resistencia ácida es intermedia (RI); con NRL entre 1 y 2, son resistentes (R); y de resistencia extrema (RE) cuando NRL es menor a 1. Esta clasificación es una adaptación de una categorización realizada por Buchanan y Edelson (1999) para respuesta de tolerancia ácida.

**Figura 24:** Distribución de frecuencia de las cepas STEC O157 y EC O157 TSN de acuerdo con la respuesta para los sistemas RA1, RA2, RA3 y Control (C)



Eje x: RE, Resistencia Extrema; R, Resistencia; RI, Resistencia Intermedia; y S, Sensibles  
Eje y: Cantidad o número de cepas

En las distribuciones vemos que hay una gran variabilidad en las respuestas dependiendo del mecanismo de RA estudiado y en relación con la toxicidad de las cepas. En ese sentido observamos que en el control del desafío ácido (C) el 93% (50/54) de las cepas STEC O157 fueron sensibles al desafío y también las EC O157 TSN fueron sensibles en el 75% de los casos, como era de esperar ya que en los ensayos de control no actúa ningún mecanismo de resistencia ácida, aunque algunas cepas STEC O157 (4) y otras EC O157 TSN (12), tiene RI, es decir que después de las 6 h de exposición al desafío, tienen todavía células viables ( $10^2$ - $10^4$ ) en el medio de control.

El sistema oxidativo (RA1) no fue muy protectorio para las cepas en el desafío ácido ya que hubo un 65% de STEC O157 y un 48% de EC O157 TSN sensibles, sólo un 7,4% y un 12,5%, respectivamente, fueron resistentes. La distribución de frecuencia muestra que el mecanismo que provee mayor resistencia ácida a las cepas de *E. coli* O157, es el dependiente de Glutamato (RA2) ya que un 80% (43/54) de STEC O157 y un 92% (44/48) de EC O157 TSN presentan RE. Para el caso del mecanismo RA3, la distribución de la frecuencia muestra cepas en las cuatro categorías de RA definidas, con una mayor cantidad de cepas STEC O157 con RI (50%) y sólo el 15% de ellas son RE, mientras que las EC O157 TSN tienen más cepas con RE (35%) (Figura 24).

También se realizó un ranking de resistencia ácida de las cepas, de acuerdo con el mecanismo utilizado, encontramos algunas cepas STEC O157 que son muy resistentes por los tres mecanismos estudiados (en RA2 y RA3 presentan RE y en RA1 son R). Estas cepas son denominadas en el laboratorio como I-014 y FP-172. Además, también tenemos dos cepas EC O157 TSN más resistentes en el ranking de RA, estas son I-122 y FP-037 (datos no mostrados).

Por otra parte, se realizó un análisis de varianza no paramétrico para investigar si existían correlaciones entre la respuesta de RA de las cepas, y las características de su origen. Como ya se dijo, en el caso de las cepas agrupadas en *clusters*, sólo se estudió la RA de una cepa del cluster ya que se considero que la RA de todas las cepas del *clusters* debía ser igual que la de la cepa ensayada.

En lo que refiere al tipo de animal, la comparación indica que no existe ninguna diferencia significativa en la respuesta de resistencia ácida de las cepas de acuerdo con el tipo de animal (novillo, novillito, ternero, vaca o vaquillona) de donde fueron aisladas las cepas, ni

por el sexo o la raza del animal. Tampoco se encontraron diferencias en la RA de las cepas aisladas de carcasa de acuerdo con el frigorífico de donde se tomaron las muestras.

En el análisis estadístico sólo se encontró que hubo diferencias significativas de la respuesta de RA con respecto al tipo de cría de los animales (Estancia, Feedlot, Feria o NR). En ese aspecto, fue importante conocer si había diferencias entre las cepas aisladas de animales que provinieron de Estancia solamente, con respecto a las de animales criados en Feedlot, ya que sus antecedentes de cría de los animales de Feria no son conocidos. Se observó que las cepas STEC O157 presentaron diferencias significativas según la procedencia de los animales para el sistema de resistencia RA2, donde las cepas aisladas de animales de Feedlot fueron menos resistentes ( $p=0,0002$ ) que las de Estancia. Para el grupo EC O157 TSN, las cepas que provenían de Estancia fueron más resistentes que las otras ( $p=0,0054$ ) por el mecanismo RA1, en cambio para el sistema RA3 fueron más resistentes las de Feedlot ( $p=0,0231$ ).

Con el objetivo de establecer si existía alguna relación entre la respuesta de RA y la virulencia de las cepas *E. coli* O157 aisladas en este trabajo, se realizó la comparación entre los diferentes perfiles genéticos de virulencia establecidos con su respuesta de NRL obtenidos en cada ensayo de desafío ácido. Para este fin, se nombró cada genotipo de virulencia obtenido en 10 categorías de virulencia (V1-V10) y se procedió al análisis. En la tabla 17 se observa la comparación de la respuesta de todos los mecanismos de RA, con los diferentes genotipos de virulencia.

**Tabla 17:** Comparación de los perfiles de virulencia de las cepas *E. coli* O157 con la respuesta de RA

Perfil de virulencia	Nombre del perfil	Nº de cepas	NRL media		
			*RA1	RA2	RA3
<i>rfb</i> <sub>O157</sub> - <i>eae-ehxA-fliC</i> <sub>H7</sub> - <i>stx</i> <sub>2</sub> / <i>stx</i> <sub>2c</sub> (vh-a)	V1	30	3,78 <sup>AB**</sup>	0,79 <sup>AB**</sup>	2,76 <sup>BCD**</sup>
<i>rfb</i> <sub>O157</sub> - <i>eae-ehxA-fliC</i> <sub>H7</sub> - <i>stx</i> <sub>2c</sub> (vh-a)	V2	9	4,58 <sup>AB</sup>	0,99 <sup>BC</sup>	3,74 <sup>CD</sup>
<i>rfb</i> <sub>O157</sub> - <i>eae-ehxA-fliC</i> <sub>H7</sub> - <i>stx</i> <sub>2</sub>	V3	5	4,51 <sup>AB</sup>	0,94 <sup>C</sup>	3,75 <sup>CD</sup>
<i>rfb</i> <sub>O157</sub> - <i>eae-ehxA-fliC</i> <sub>H7</sub> - <i>stx</i> <sub>2</sub> ND	V4	1	4,69 <sup>AB</sup>	0,87 <sup>BC</sup>	5,30 <sup>D</sup>
<i>rfb</i> <sub>O157</sub> - <i>eae-ehxA-fliC</i> <sub>H7</sub> - <i>stx</i> <sub>1</sub> / <i>stx</i> <sub>2</sub> / <i>stx</i> <sub>2c</sub> (vh-a)	V5	4	4,17 <sup>AB</sup>	0,79 <sup>BC</sup>	1,63 <sup>AB</sup>
<i>rfb</i> <sub>O157</sub> - <i>eae-ehxA-fliC</i> <sub>H7</sub> - <i>stx</i> <sub>1</sub> / <i>stx</i> <sub>2c</sub> (vh-a)	V6	1	3,22 <sup>A</sup>	0,20 <sup>AB</sup>	2,18 <sup>ABCD</sup>
<i>rfb</i> <sub>O157</sub> - <i>eae-ehxA-fliC</i> <sub>H7</sub> - <i>stx</i> <sub>1</sub> / <i>stx</i> <sub>2</sub>	V7	4	5,01 <sup>B</sup>	0,47 <sup>ABC</sup>	3,51 <sup>BCD</sup>
<i>rfb</i> <sub>O157</sub> - <i>eae-ehxA-fliC</i> <sub>H7</sub>	V8	1	3,71 <sup>AB</sup>	0,55 <sup>ABC</sup>	4,63 <sup>CD</sup>
<i>rfb</i> <sub>O157</sub> - <i>fliC</i> <sub>H7</sub>	V9	37	3,72 <sup>AB</sup>	0,37 <sup>AB</sup>	2,28 <sup>ABC</sup>
<i>rfb</i> <sub>O157</sub>	V10	10	3,87 <sup>AB</sup>	0,21 <sup>A</sup>	1,18 <sup>A</sup>
		<i>p</i>	0,0265	<0,0001	<0,0001

\*RA1: sistema oxidativo o reprimido por Glucosa, RA2: sistema de resistencia ácida dependiente de Glutamato, RA3: sistema dependiente de Arginina.

\*\*dentro de una columna medias con una letra en común no son significativamente diferentes.

En el caso del mecanismo RA<sub>1</sub>, se observó que V6 es significativamente diferente de V7. En los mecanismos RA2 y RA3, el grupo que se destacó como más resistente y significativamente diferente a los otros, fue el perfil V10. Este perfil, en RA2 presentó una NRL promedio de 0,21 y fue significativamente diferente a V2, V3, V4 y V5 ( $p < 0,0001$ ) y por el mecanismos RA3, el NRL promedio fue de 1,18 y fue distinto a V1, V2, V3, V4, V7 y V8 ( $p < 0,0001$ ). El perfil de virulencia V10 corresponde a cepas EC O157 TSN, a las cuales no se les pudo determinar el antígeno flagelar con la metodología de caracterización utilizada en este trabajo.

## 5. DISCUSIÓN

*Escherichia coli* productor de toxina Shiga es un importante patógeno que se transmite a través de los alimentos capaz de producir diarrea no sanguinolenta, colitis hemorrágica, y síndrome urémico hemolítico. El SUH es la complicación más grave que se produce en el 5 al 10% de los pacientes y se caracteriza por producir anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia y falla renal aguda. En nuestro país, el SUH posentérico es endémico. Estudios en niños con SUH, mostraron que la principal causa de SUH fue la infección por STEC (59%) y el serotipo prevalente es el O157:H7 (75%). En los últimos 10 años se reportaron aproximadamente 500 casos de SUH por año. La incidencia ha variado entre 7,8 a 17 casos cada 100.000 niños menores de 5 años de edad, siendo esta la incidencia más alta a nivel mundial, con una mortalidad del 2 al 5%. En la Argentina, el SUH es la principal causa de insuficiencia renal aguda en niños, la segunda causa de falla renal crónica, y representa la causa del 20% de los trasplantes renales de adolescentes y niños (Rivas y col, 2011). Por otra parte, tanto en Argentina, como en Europa continental, como Oceanía, y África la enfermedad se presenta usualmente en forma de casos individuales (Mainil y Daube, 2005) más que de brotes que afectan a muchos individuos como es más frecuente EEUU.

La infección en humanos se produce con mayor frecuencia por la ingestión de alimentos o agua contaminada. En casos menos frecuentes se puede producir por contacto directo con los animales, o bien por la transmisión persona a persona. Es conocido que el ganado vacuno es el mayor reservorio de STEC, por tal motivo, los principales alimentos relacionados con la infección son los de origen bovino, sobre todo a través del consumo de carne molida o hamburguesas poco cocidas, y de leche sin pasteurizar. La infección también se produce por el consumo de agua, o de otros alimentos contaminados sea, con deyecciones ganaderas, o a través de contaminación cruzada, o de comidas inadecuadamente preparadas, almacenadas o

cocidas. También se han reportado casos por aguas recreacionales contaminadas (Gyles, 2007).

Las STEC son transportados en el tracto gastrointestinal, sobre todo a nivel del recto, por el ganado bovino sano, y en menor grado por otros rumiantes. La colonización de los animales es transitoria con una excreción en materia fecal suele durar hasta dos meses, siendo crítica la contaminación con materia fecal que acontece en el ordeño y en la faena y procesamiento de la carne (Mainil y Daube, 2005).

El riesgo de ETA originado por el consumo de productos cárnicos contaminados con STEC es determinado por factores propios del microorganismo, como su patogenicidad y dosis infectiva, y por la exposición de la población al mismo a través del consumo de carnes. Entre aquellos factores que modifican el nivel de exposición están, en primer término los niveles de contaminación del patógeno en el producto cárnico. En segundo lugar, la cantidad de carne o productos cárnicos consumidas por persona por día. Y en tercero, los hábitos de consumo de la carne y especialmente las formas de preparación y cocción (Rhoades y col., 2009). Así en la mayoría de los países europeos el consumo promedio diario de carne y productos cárnicos por persona es de menos de 10 g, con algunas excepciones, como Irlanda e Italia, donde el consumo es mayor a 60 g. En comparación, en EEUU el consumo es de casi 120 g diarios, y en nuestro país, el consumo *per cápita* es de aproximadamente 170 g por día. Es decir que los argentinos, somos comparativamente importantes consumidores de carne, lo cual aumentaría el riesgo de exposición a una ETA por esa vía, y en particular aumentaría el riesgo de SUH.

En tercer término, respecto de la influencia de los hábitos de consumo en el riesgo, existen diferencias regionales, ya que, en EEUU las hamburguesas han sido la mayor causa de brotes de infección con *E. coli* O157:H7, mientras que en Europa el consumo de

hamburguesas no ha sido identificado como una fuente de infección (Gyles, 2007). Otro hábito de consumo relevante es el consumo intencional de carne cruda, o ligeramente cocida, el cuál es menos común en la Argentina, que en EEUU o en países de Europa donde actualmente está de moda el consumo productos con carne cruda como el *steak tartar*, carpaccio, etc. En un estudio realizado en nuestro país sobre los factores de riesgo para la infección esporádica con STEC en niños, se mostró que el consumo de carne mal cocida es el mayor factor de riesgo asociado a la enfermedad por STEC O157, pero este hábito de consumo depende de la zona del país que se analice, ya que en Mendoza no se encontró este factor de riesgo asociado, lo que sugirió que esta población no consumiría carne poco cocida. Sin embargo, si presentó como conducta de riesgo la costumbre de dar a los niños a tomar el jugo de bife semicocido, mucho más común en el interior del país (Rivas y col., 2008).

En lo referido a los niveles de contaminación del patógeno en el producto cárnico, existen varios estudios sobre la prevalencia de STEC realizados en EEUU y Europa, para establecer líneas de base de este patógeno en la producción ganadera y la industria frigorífica. Datos de similares características, obtenidos en condiciones de producción local son importantes para realizar una evaluación de riesgo certera del SUH en la Argentina. En nuestro país, y desde hace varios años se han realizado estudios que han aportado información de la contaminación con STEC en el reservorio bovino a nivel de finca o feedlot (Sanz y col., 1998; Parma y col., 2000; Mercado y col., 2004; Padola y col., 2004). Sin embargo, los estudios de prevalencia de STEC O157, empleando metodologías sensibles en ganado y productos cárnicos han sido menos frecuentes. Algunos de los estudios precedentes reportaron una carga del 39% de STEC no-O157 en novillos jóvenes y sólo un 0,5% de *E. coli* O157 (Meichtri y col., 2004). Tanaro y col. (2010), encontraron una incidencia del 3,8% de *E. coli* O157 en materia fecal de bovinos a nivel de campo. También en estudios de alimentos relacionados, se detectó un 6,8%

STEC O157 en hamburguesas crudas (Chinen y col., 2009) y un 1,9% de STEC O157 en productos cárnicos en boca de expendio en Concepción (provincia de Tucumán) (Jure y col., 2010), mientras que Brusa y col. (2013), encontraron una contaminación del 25,5% en muestras de carne en carnicerías de Berisso (Provincia de Buenos Aires). Hasta el momento de realizarse este trabajo no se habían realizado estudios sobre ganado vacuno a nivel de plantas de procesamiento con metodologías comparables a otros estudios internacionales.

En este cuadro de situación, donde es conocida la importancia del *E. coli* O157 como principal responsable de SUH posentérico, con una gran tasa de incidencia en nuestro país. Y, donde por otra parte, se sabe que, el consumo de carne vacuna es un importante factor de riesgo en la transmisión de este microorganismo, y que además los antecedentes de incidencia de este patógeno en la cadena de la carne eran poco consistentes con la alta tasa de SUH, se planteó como hipótesis inicial que la alta incidencia del SUH en Argentina pudiera estar relacionada con una alta prevalencia de *E. coli* O157 en el ganado bovino de nuestro país, transferible a la carne en el proceso de faena. Otra cuestión importante a saber es, si las cepas circulantes en ganado bovino eran compatibles con las responsables de producir la enfermedad. Y también si presentaban alguna característica diferencial, como puede ser la mayor resistencia al estrés ácido, que permitiría sobrevivir en condiciones ambientales desfavorables, como pueden ser los alimentos ácidos o las condiciones ácidas del estómago.

Por lo tanto, el objetivo general de este trabajo de tesis fue determinar el nivel de contaminación con *E. coli* O157 del ganado vacuno faenado en nuestro país a nivel de las plantas de procesamiento y caracterizar los aislamientos obtenidos para conocer su potencial patogénico, sus características epidemiológicas y su resistencia a condiciones ácidas.

Este estudio fue diseñado para establecer la prevalencia de *E. coli* O157 en ganado de carne a nivel de las plantas procesadoras de Argentina y el nivel de contaminación de las carcasas luego del procesamiento. Para este fin se seleccionaron nueve frigoríficos de carne

vacuna, de los cuales 6 estaban clasificados entre los diez más grande del país en términos de producción, por lo que se considera que este trabajo describe y cuantifica la contaminación existente en las actuales condiciones de producción de una parte significativa de la producción local. La mayoría de los frigoríficos seleccionados producen cortes de exportación por lo que cuentan con importantes sistemas de inocuidad y calidad, tales como BPM, HACCP, auditorías externas, etc., que no se encuentran en las plantas proveedoras para el mercado interno, ya sea a nivel nacional, provincial y mucho menos a nivel municipal.

Otro de los factores considerados para la estimación de la prevalencia, fue el número de muestras a estudiar. En algunos estudios de prevalencia realizados en nuestro país, el número de animales muestreados y tipo de animales seleccionados fueron mucho más acotados. Uno de esos primeros estudios de prevalencia de STEC fue realizado por Sanz y col. (1998), donde se estudiaron 126 terneros y 118 vacas en el corral antes de entrar la playa de faena. Este fue uno de los trabajos con mayor número de animales muestreados (244). En otro estudio, se analizaron 200 novillos en la línea de faena (Meichtri y col., 2004), también existen otros estudios a nivel de finca donde se analizaron, en uno de ellos, 244 terneros enfermos y saludables (Parma y col., 2000) y en otro, 76 terneros con diarrea (Mercado y col., 2004), en la región pampeana. Por otra parte, todos estos trabajos estuvieron diseñados para la detección de STEC en general y no particularmente el serotipo O157. Por el contrario, en el presente estudio se calculó un número representativo de 811 animales a analizar y no se seleccionó el tipo de animal a muestrear, sino que el mismo estuvo definido por el tipo de hacienda faenada por cada establecimiento. Por otra parte, la metodología utilizada fue diseñada para detectar STEC O157 específicamente.

Con respecto al procedimiento de toma de muestra, las muestras de MF se realizaron en la bandeja de vísceras verdes, por expulsión del contenido fecal del recto. Se tomo entre 20 y

50 g de material, para luego procesar 10 g en el laboratorio. Esta cantidad de muestra es mucho mayor que la utilizada en otro trabajo realizado por Meichtri y col. (2004) donde solo se procesaban 2 g de MF o de otros estudios donde el muestreo se realizó por hisopado rectal. Además, antes de comenzar este estudio de prevalencia, se realizaron ensayos de detección y recuperación de STEC O157 con MF y esponjas inoculadas con cantidades decrecientes de una cepa de *E. coli* O157:H7 de laboratorio y de esta manera se evaluó la efectividad de la técnica (dato no mostrado). El lugar y procedimiento de muestreo de MF, resultó ser la forma más estandarizada para la recolección de MF a nivel de frigorífico.

Para la toma de muestra de CA, se seleccionó la metodología más exhaustiva utilizada por el USDA (2005) para controlar los frigoríficos con algún antecedente de contaminación con *E. coli* O157:H7. Esta metodología consiste en esponjar 8000 cm<sup>2</sup> de cada canal, antes del ingreso a la cámara frigorífica, lo cual es una superficie 80 veces mayor que lo requerido por SENASA para el control obligatorio de los frigoríficos de exportación para investigar la presencia de *E. coli* O157:H7/NM durante la faena (SENASA, Circular 3496/02).

También, en el laboratorio, la metodología de análisis usada fue consistente con la finalidad de establecer una línea de base de la contaminación, ya que todas las muestras fueron analizadas con el método más sensible para la detección de *E. coli* O157 disponible: la separación inmunomagnética (SIM). Esta técnica posee una gran sensibilidad, con el 95% de probabilidad de detectar 5UFC/g de *E. coli* O157 en materias fecales bovinas (Omisakin, y col., 2003) y empleando cantidades sustanciales de muestra, tanto en gramos de materia fecal como de superficie de carcasa muestreados. Por ello se considera que la información aportada es valiosa para establecer la prevalencia de este patógeno a la entrada y a la salida de la línea de faena, dada la forma sistemática y uniforme en que este trabajo fue realizado, empleando

metodología robusta de toma de muestra y análisis que aseguran la representatividad de los datos relevados.

El esquema general de tratamiento de las muestras consistió en que luego de hacer un enriquecimiento selectivo de las muestras de MF y CA para favorecer el crecimiento de *E. coli* O157, se aplicó la SIM con el objeto de concentrar este grupo microbiano a través de una reacción inmunológica específica para el antígeno somático O157. A las muestras concentradas, se las sembró en medios selectivos y diferenciales como lo muestra el esquema de la figura 8. A partir de la zona de confluencia de estos cultivos, se realizó un primer paso de screening por PCR múltiple. Con los resultados de esta PCR se obtienen muestras de MF o CA presuntamente positivas para *E. coli* O157, como se observa en el esquema de recuperación de cepas (Figura 12). En el caso donde esta PCR múltiple inicial detectó la presencia del gen *rfb*<sub>O157</sub> y de algún gen *stx*, la muestra se consideró presuntamente positiva para STEC O157 y como más del 80% de estas cepas aisladas no fermentan sorbitol, entonces se repicaron para el aislamiento, colonias típicas de este grupo, Sob (-). Mientras que si la PCR sólo se detectaba el gen *rfb*<sub>O157</sub>, las muestras se consideraron presuntamente EC O157 TSN positiva, y en consecuencia, para la recuperación se seleccionaron los dos tipos de colonias, las Sor (-) y también las típicas de *E. coli* genérico, Sor (+). Dado que el esquema de aislamiento utilizado en este trabajo, está más bien diseñado para la selección de cepas STEC O157 por los medios de cultivos utilizados (ID-O157 y CT-SMAC), la recuperación de cepas EC O157 TSN en el laboratorio fue mucho más dificultosa, siendo probablemente una de las razones del menor porcentaje de recuperación (56%) obtenido para este grupo (Tabla 4). Otros de los motivos de la menor recuperación a considerar es que, a las muestras presuntivas para STEC O157, no se les busco además cepas no productoras de toxina (EC O157 TSN).

En este estudio, el grado de portación promedio de STEC O157 en bovinos a la entrada de los frigoríficos, medida en su contenido fecal, fue en promedio del 4,1% [2,9-5,6%, 95% intervalo de confianza (IC)].

La comparación de los resultados de prevalencia obtenidos en este trabajo con otros estudios similares en diferentes países y años, es dificultosa debido a las diferencias en las metodologías empleadas, estaciones del año en que se realizó el muestreo, tipos de bovinos muestreados, entre otras. Una revisión realizada por Rhoades y col. (2009), analizó y recopiló varios estudios de prevalencia en bovino en países de Norteamérica, Europa y otros, donde la prevalencia del serotipo O157 en ganado bovino, por ejemplo para los estudios norteamericanos van desde 0,3% hasta un 27,6% y en los estudios europeos, se encuentran desde 0% hasta un máximo de 16,6%. Los muestreos en estos trabajos presentan una gran diversidad en el punto de toma de muestra (feedlot, finca o frigoríficos), en los tipos de animales muestreados (ganado lechero, de carne, bovinos adultos o jóvenes, mezcla de animales o en algunos casos no tuvieron en cuenta el tipo de animal muestreado), en la época del año y región donde se realizó el muestreo y sobre todo presentan una gran variabilidad en la cantidad de animales muestreados (Tabla 18).

Por lo tanto existe una gran disparidad de resultados, pero en general se observa que los valores de prevalencia más altos fueron reportados en animales criados en corrales de engorde (feedlot), sobre todo en EEUU (27,8%) donde es muy común esta práctica. La misma tendencia se observa en los estudios europeos donde el valor más alto corresponden a un estudio de un feedlot en Italia (17%) donde se muestrearon sólo 100 animales, pero los corrales de engorde son poco frecuentes en Europa, quizás por ello los estudios de esta región revelan una más baja prevalencia de STEC O157. Tanto los estudios europeos como los americanos donde los muestreos se realizaron en animales criados a campo, los valores de

prevalencia no superan el 11% (Rhoades y col., 2009). Incluso en un trabajo realizado en nuestro país por Tanaro y col. (2010), el cual estudió la incidencia de *E. coli* O157 en bovinos a nivel de finca, encontró una prevalencia del 3,8%.

**Tabla 18:** Selección de estudios sobre prevalencia de STEC O157 en materia fecal bovina

País	Año de muestreo	Punto de muestreo	N° de muestras*	Tipo de animales	%**	Referencias
Holanda	1996	Finca	937	Adultos/Terberos	6,3	Heuvelink y col., 1998
Canadá	1996	Frigorífico	1247	Terberos/Vacas	7,5	Van Donkersgoed y col., 1999
Rep. Checa	1998	Finca	163	Terberos	5,5	Cizek y col., 1999
Italia	1999	Frigorífico	100	Mezcla	17	Bonardi y col., 2001
Dinamarca	1999	Finca	2419	Vacas lecheras	3,6	Nielsen y col., 2002
Irlanda	1999	Frigorífico	250	Mezcla	2,4	McEvoy y col., 2003
Noruega	1999	Frigorífico	1541	Adultos/terberos	0,2	Johnsen y col., 2001
EEUU	1999	Frigorífico	327	Novillos/Novillitos	27,8	Elder y col., 2000
Inglaterra	2001	Frigorífico	4800	Mezcla	12,9	Chapman y col., 2001
EEUU	2001	Feedlot	10622	Novillos/Novillitos	10,2	Sargeant y col., 2003
EEUU	2001	Finca	296	Vacas	9,1	Riley y col., 2003
Canadá	2001	Frigorífico	8682	Novillos/Novillitos	1,9	Berg y col., 2004
Corea del Sur	2002	Finca/Frigorífico	864	Ganado de carne	1,7	Jo y col., 2004
EEUU	2002	Frigorífico	1189	No especificado	5,9	Barkocy-Gallagher y vol., 2003
Argentina	2002	Frigorífico	200	Terberos	0,5	Meichtri y col., 2004
Suiza	2003	Finca	892	Ganado lechero	4,6	Kuhnert y col., 2005
México	2004	Finca	240	Mezcla	1,3	Callaway y col., 2004
Argentina	2006	Finca	288	Terberos	3,8	Tanaro y col., 2010
Argentina	2008	Frigorífico	811	Mezcla	4,1	Masana y col., 2010

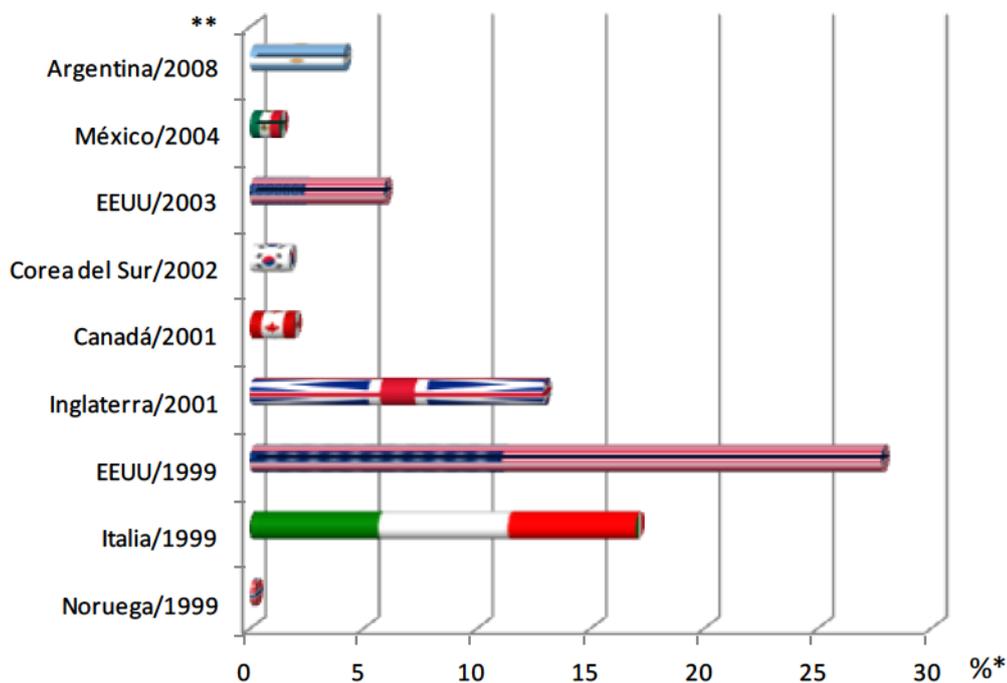
Adaptado de Rhoades y col., 2009.

\*Número de muestras examinadas

\*\*porcentaje de prevalencia

En consideración de esto, se puede decir que el valor de portación promedio hallado en el presente estudio, se encuentra dentro del rango de los valores de prevalencia reportados internacionalmente como lo podemos ilustrar en la siguiente figura (25). Por lo tanto, no podría considerarse que la alta incidencia de SUH en nuestro país esté relacionada con una alta prevalencia de STEC O157 en ganado bovino faenado en frigoríficos de exportación.

**Figura 25:** Comparación de los porcentajes de prevalencia en ganado bovino encontrados en distintas regiones del mundo



\*porcentaje de prevalencia

\*\*País/Año del estudio

Con respecto a la incidencia de un 4,7% (38/811) de EC O157 TSN en el contenido fecal de los animales, su hallazgo fue sorprendente debido a los poco antecedentes sobre este grupo cuando se inicio el trabajo de investigación. Se conoce que existen, tanto en humanos como en el ambiente, variantes *stx*-positivas y *stx*-negativas de *E. coli* O157:H7/H<sup>-</sup> (Galland y col., 2001). En algunos estudios realizados en Alemania, se han asociado con la enfermedad, cepas *stx*-negativas aisladas de materia fecal de pacientes con diarrea o SUH (Schmidt y col., 1999; Bielaszewska y col., 2007; Friedrich y col., 2007). En estos trabajos, las *stx*-negativas en

algunos casos, eran fenotípicamente fermentadoras de sorbitol (FS). A partir de allí, algunos investigadores, comenzaron a prestar atención a la presencia de *E. coli* O157 FS y/o *stx*-negativas en ganado. Algunos trabajos caracterizaron cepas FS (Lee y col., 2006) y *stx*-negativas aisladas de animales y las compararon con aislamientos humanos (Stephan y col., 2009). En España, Díaz y col. (2011), encontraron una prevalencia del 1,5% de *E. coli stx*-negativas en ciervos muestreados en fincas de caza, mientras que un estudio reciente realizado en Turquía mostró una incidencia del 4,2% de *E. coli* O157:H7/H<sup>-</sup> en hisopados rectales de bovinos en frigoríficos; 4,6% en carcasas y un 21% en aguas residuales, de los cuales, 15 aislamientos fueron *stx*-negativos (Ayaz y col., 2014). En este último trabajo, la metodología de aislamiento fue muy similar, ya que luego de un enriquecimiento selectivo para *E. coli* O157 en caldo EC suplementado con Novobiocina, se aplicó SIM y se sembró el concentrado en placas de agar CT-SMAC. Solo se diferenció en que la detección de *E. coli* O157 fue realizada por aglutinación en látex (LA). Por lo tanto, todos estos estudios muestran que el hallazgo de cepas *stx*-negativas es más usual que lo supuesto.

Con respecto a otros factores que pueden influir en la prevalencia de *E. coli* O157 en los animales, es conocido que la edad, el tipo de alimentación, el sistema de cría, extensiva o intensiva, y distintas características del origen y tipo de ganado (lechero o de carne), pueden influenciar la mayor o menor excreción de *E. coli* O157, aunque son más limitadas las evidencias sobre la influencia de la raza y el género (Rhoades y col., 2009). Por tal motivo, se analizaron los datos de prevalencia de acuerdo a diferentes categorías por edad, raza, sexo, tipo de crianza o sistema de cría con el que fueron producidos y lugar de origen.

De acuerdo con la edad y el sexo, los animales muestreados se pueden dividir en terneros, novillitos, vaquillonas y animales adultos compuestos de novillos y vacas, siendo estas últimas por lo general, animales de reposición de la producción lechera.

En trabajos previos realizados en nuestro país, se encontró una mayor prevalencia de STEC en ganado joven compuesto por novillitos (39%) en comparación con la prevalencia en novillos adultos (4%) (Meichtri y col., 2004). En dicho estudio, la prevalencia en novillitos del serotipo de STEC O157 fue muy bajo (0,5%), en comparación con la reportada ahora para el mismo tipo de animal que alcanza un 5,1%. Este resultado confirmó la hipótesis realizada en el diseño de muestreo donde se presuponía que el método de aislamiento de las *E. coli* O157 por separación inmunomagnética (SIM) aumentaría cerca de 10 veces la frecuencia de aislamiento de este serogrupo.

Por otra parte, en este trabajo se observó mayor incidencia de STEC O157 en los animales jóvenes, terneros y vaquillonas (8,5% y 10,5%, respectivamente), en comparación con el ganado adulto, novillos y vacas (3,5% y 1,5%, respectivamente). En un estudio realizado en Dinamarca por Nielsen y col. (2002) sobre STEC O157 en las heces de ganado bovino lechero, también observaron la influencia etaria en la prevalencia en los animales. Mostraron que terneros entre 2 y 6 meses de edad tienen un pico de incidencia de 8,6%, mientras las vacas adultas presentaban un valor de solo 2,4%. En este estudio danés, la incidencia global fue del 3,6% en MF, similar a la obtenida en nuestro estudio. Sin embargo, Dinamarca es un país con muy baja incidencia de casos humanos de CH y SUH, comparada con otros países (Nielsen y col., 2002), lo cual muestra que existen otras variables, además de la prevalencia en animales, que influyen en la incidencia de la enfermedad.

También se observó mayor portación de EC O157 TSN en Terneros (17%, 8/47) en MF. La distribución de la contaminación de acuerdo con la edad de los animales muestreados no siempre se ve reflejada al final de la línea de faena en las carcasas porque el nivel de contaminación de las CA se encuentra influenciado por otros factores ajenos al tipo de animal.

Con respecto a la procedencia del ganado, de las nueve provincias muestreadas, la mayor cantidad de animales (42%) provino de Buenos Aires, donde la incidencia de STEC O157 fue muy similar al valor promedio (4%). Sin embargo, hubo tres provincias que mostraron mayor incidencia de STEC O157 en los animales en pie, estas fueron Corrientes (10%, 4/39), Santiago del Estero (8%, 1/12) y Entre Ríos (6%, 5/90). Es importante considerar que la Argentina es un país muy extenso, por lo que se deben considerar las diferencias climáticas entre las distintas regiones, así como también las distancias que deben recorrer los animales desde las fincas de origen hasta los frigoríficos donde serán procesados. Estas dos razones podrían influenciar el nivel de contaminación encontrado en estas tres provincias mencionadas, aunque en el caso de Santiago del Estero los animales muestreados fueron muy pocos (12), por lo que el resultado carece de representatividad. En el aspecto climático, son reconocidas las elevadas temperaturas en los meses cálidos, además de la alta humedad del ambiente que presentan las provincias de Corrientes y Entre Ríos, por pertenecer a la Mesopotamia. En un trabajo de Rivera-Betancourt y col. (2004), realizado en dos plantas de EEUU, separadas geográficamente, se mostró que la prevalencia en el cuero de los animales tiene una influencia regional influenciada en forma directa por el clima.

Por otra parte, los frigoríficos donde fueron faenados todos los animales de este estudio se encuentran en las provincias de Buenos Aires y Santa Fe, y por lo tanto debieron ser trasladados desde su lugar de origen hasta estas dos provincias. El hacinamiento en los camiones durante el tiempo de transporte, puede implicar una mayor transferencia de contaminación entre los animales de la tropa, además de sufrir mayor estrés previo a la faena, lo que induce un aumento excreción de bacterias entéricas (Koohmaraie y col., 2007; Brichta-Harhay y col., 2008). La influencia del transporte y del estrés prefaena en la contaminación con *E. coli* O157 podría ser un tema para estudiar a futuro.

La distribución de la contaminación con STEC O157 por lotes de animales, muestra que en la mayoría (86%) de los lotes o tropas no se detectaron bovinos positivos en la MF (0/6). Sin embargo en algunas tropas particulares la contaminación alcanzó hasta 5 de 6 animales muestreados. De hecho, tan solo 4 de los 136 lotes analizados, representan el 45% (15/33) de la prevalencia encontrada en materia fecal. Este resultado remarca la aleatoriedad de la contaminación en los rodeos. En un trabajo de prevalencia en ganado vacuno a nivel de planta de procesamiento realizado en Canadá (van Donkersgoed y col., 1999), encontraron una prevalencia de *E. coli* O157:H7 del 7,5% de bovinos provenientes de campo y feedlots, y un 19,5% de los lotes muestreados tenía al menos 1 animal positivo. Estos resultados se asemejan a los datos encontrados en el presente trabajo. Por otro lado, un estudio realizado por Elder y col. (2000), encontró una prevalencia muy alta (>27%) y presentó más de un 72% de los lotes positivos. Cabe recordar que todos los animales faenados en el trabajo de Elder provenían de feedlot.

Varios autores indican que, en los rodeos bovinos, existe un patrón de excreción esporádica de *E. coli* O157, con períodos epidémicos de excreción transitoria (1 a 2 meses) (Duffy y col., 2006) intercalados con periodos de no excreción, y que estas períodos epidémicos se producen principalmente durante los meses de clima cálido (Hancock y col., 1998). Además, algunos estudios que cuantificaron la contaminación con *E. coli* O157 en las heces, sugieren que dentro de un rodeo pueden presentarse unos pocos animales con una alta concentración de bacteria excretada, denominados “*supershedders*”, o sea super-excretores. Estos super-excretores tienen un mayor potencial de diseminación de la contaminación al resto del ganado o a las canales durante el procesamiento (Cobbold y col, 2007; Omisakin y col, 2003). Por otra parte, un estudio de Nielsen y col. (2002) mostró que la probabilidad de encontrar animales positivos para STEC O157 en los rebaños, fue independiente del tamaño

del hato, pero si está influenciada por la mayor cantidad de terneros en el rebaño, al igual que por la introducción de animales nuevos, que es un importante factor de riesgo. Datos como estos, respecto del tamaño y las características de los rebaños de donde provenían los animales, o la concentración de STEC en materia fecal, son datos que podrían explicar la aleatoriedad de la contaminación encontrada, pero no contamos con ellos en este estudio.

El presente trabajo se realizó durante 17 meses ininterrumpidos, tratando de mantener similar cantidad de muestras por mes. Los resultados mostraron que no hubo ninguna tendencia definida de prevalencia mensual. Esto podría explicarse teniendo en cuenta que, por la aleatoriedad de la contaminación con STEC O157, el número de muestras mensuales a analizar para poder comparar de forma representativa la contaminación mes a mes, debería ser mucho mayor. Un estudio con esa finalidad realizado por Chapman y col. (2001), requirió 400 muestras mensuales, número significativamente mayor que las 45 muestras mensuales promedio en el presente trabajo.

Varios trabajos (Barkocy-Gallagher y col., 2003; Berends y col., 2008) mostraron un comportamiento estacional en la excreción de enterobacterias y en particular de *E. coli* O157, siendo significativamente mayor la excreción en los meses de primavera y verano, favorecida por las altas temperaturas y la mayor cantidad de precipitaciones. En este trabajo, la mayor prevalencia de STEC O157 en las materias fecales se observó en primavera (5,7%), y en el caso de las EC O157 TSN en invierno (Figura 18). Sin embargo, estos resultados deben considerarse con cautela, ya que pueden haber sido influenciados por otros factores como el tipo, edad y origen de los bovinos, los que fueron variables durante las estaciones, y donde las condiciones climáticas en una misma estación del año pueden ser muy variables por la latitud en la que se encuentra. Por estas razones, el efecto estacional puede estar silenciado, ya que en este estudio no se intentó controlar estos factores.

Muchos estudios muestran mayor prevalencia de *E. coli* O157 en ganado de engorde en feedlot que en ganado lechero alimentados a pasto en el campo (Hancock y col., 1998; van Donkersgoed y col., 1999; Bonardi y col., 2001). Es probable que los animales alimentados a pasto experimenten un menor contacto entre animales que los animales en los corrales de engorde, donde incluso la contaminación del suelo puede estar más concentrada. Quizás por este motivo, muchos trabajos muestren mayor prevalencia en feedlot (Rhoades y col., 2009). Sin embargo, en el presente trabajo el tipo de sistema de cría (Estancia o feedlot) no mostró ninguna tendencia en la incidencia de STEC O157 de los animales de feedlot con respecto a los animales de pastoreo. Cabe recordar que el número de muestras provenientes de feedlot fueron casi la decima parte de la cantidad de muestras de estancia, y por ello los grupos no son comparables. Este es un punto interesante a abordar en otros estudios adicionales, para establecer y comparar la prevalencia de STEC O157 de acuerdo al sistema de producción, tales como los feedlot que son cada vez de uso más común en nuestro país.

El grado de portación de STEC O157 luego del procesamiento primario en las carcasas fue del 2,6% [1,6-3,9% (95% IC)]. Al considerar este resultado hay que recordar que, de acuerdo con la metodología del FSIS elegida, se muestrea un área muy grande de la canal (alrededor del 60%), con el fin de maximizar la posibilidad de recuperación de STEC O157. Por otra parte, la toma de muestra se realizó pos evisceración, luego de los recortes y lavados, y previo a la entrada a cámara de enfriamiento y además, ninguno de los frigoríficos participantes llevó a cabo durante este estudio, una etapa o procedimiento de descontaminación de las canales, ya sea con ácidos débiles o vapor.

Distintos estudios a nivel mundial sobre la incidencia de STEC O157 en carcasa a nivel de plantas de procesamiento muestran diferentes valores de prevalencia, que varían en un rango de 0 a 17,8% (Tabla 19). Esos estudios presentan diferencias metodológicas, tales como

el lugar de toma de muestras o el tamaño de la superficie muestreada, o particularidades del tipo y número de animales analizados, que influyen en los valores de prevalencia obtenidos. Un estudio en EEUU de Arthur y col. (2004), indica un valor de contaminación de las carcasas posevisceración de un 3,8% de un total de 288 muestras analizadas. A pesar de tener la misma cantidad de área muestreada ( $2 \times 4000 \text{ cm}^2$ ) que en el citado estudio, vemos que una menor cantidad de animales presentaron mayor prevalencia que la determinada en el presente trabajo. Esta diferencia probablemente se deba a que el ganado muestreado en el trabajo de Arthur, provenía de sistemas de cría en feedlot. Hay otros estudios sobre la incidencia de *E. coli* O157 en carcasa determinados en los establecimientos de faena, donde los niveles de contaminación de las carcasas son menores, pero cabe aclarar que en esos casos también las superficies muestreadas fueron más pequeñas (Chapman y col., 2001; Philips y col., 2001; Heuvelink y col., 2001). Un trabajo de Elder y col. (2000), obtiene un valor del 17,8% pos evisceración y luego de operaciones de intervención el valor baja a un 1,8%. En ese trabajo además, los animales que se faenaban en las 4 plantas muestreadas, también provenían de feedlots.

**Tabla 19:** Selección de estudios en diferentes países de STEC O157 en canales a nivel de frigorífico

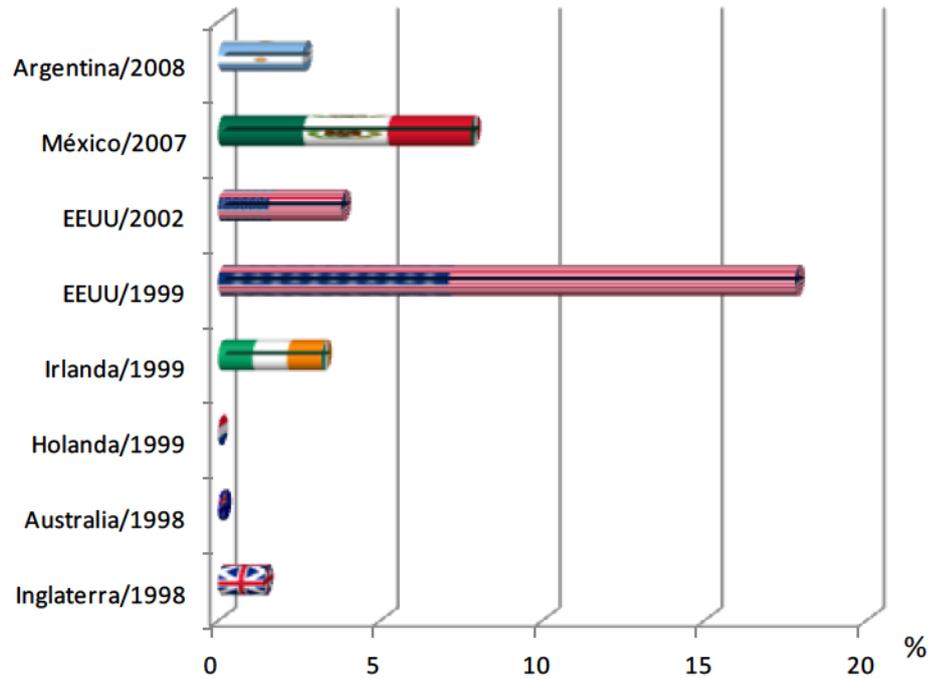
País	Año de muestreo	Área de muestreo	Punto de muestreo	Nº de muestras*	%**	Referencias
México	No especificado	3 x 100 cm <sup>2</sup>	Posintervención	258	7,8	Varela-Hernández y col., 2007
Inglaterra	1998	100 cm <sup>2</sup>	Posevisceración	1500	1,4	Chapman y col., 2001
Australia	1998	3 x 100 cm <sup>2</sup>	En cámara	1275	0,1	Philips y col., 2001
Holanda	1999	3 x 5 cm <sup>2</sup>	En cámara	270	0,0	Heuvelink y col., 2001
Irlanda	1999	Todo el animal	Posintervención	250	3,2	McEvoy y col., 2003
EEUU	1999	3 x 250 cm <sup>2</sup>	Posevisceración	332	17,8	Elder y col., 2000
EEUU	2002	2 x 4000 cm <sup>2</sup>	Posevisceración	288	3,8	Arthur y col., 2004
Argentina	2008	2 x 4000 cm <sup>2</sup>	Sin intervención	811	2,6	Masana y col., 2010

\*Número de muestras examinadas  
Adaptado de Rhoades y col., 2009.

\*\*porcentaje de prevalencia

Por lo tanto, comparando con otros estudios observamos que el grado de contaminación de las carcasas obtenido (2,6%) se encuentra dentro del rango de otros reportados en distintos países (Figura 26).

**Figura 26:** Comparación de los porcentajes de prevalencia de carcasas bovinas encontrados en distintas regiones del mundo a nivel de playa de faena



Por otro lado, se muestrearon en promedio 90 animales por cada frigorífico participante. La contaminación de las materias fecales por STEC O157 detectadas por cada establecimiento varían entre 1,1 a 9,5% y no hubo frigoríficos sin algún animal positivo en MF (Tabla 6), pero en general la contaminación depende del tipo de hacienda faenada y de sus características particulares y no del frigoríficos en sí. La contaminación de las carcasas con STEC O157 baja a 2,6% en promedio, para todos los frigoríficos analizados, pero la contaminación varía entre ellos, desde 0 hasta el 11% de prevalencia. En seis de los frigoríficos participantes, la prevalencia en las carcasas fue menor que en las muestras fecales (frigoríficos B, C, D, E, F y H). Lo contrario ocurrió en los frigoríficos A, G, e I (Tabla 6), donde la contaminación en CA fue mayor que en MF.

La mayoría de establecimientos participantes son de exportación y en general, de la más alta capacidad tecnológica del país, pero particularmente uno de ellos, el frigorífico G, produce principalmente carne para consumo interno, por eso el tipo de hacienda faenada fue mixta y el tipo de animal predominante fueron terneros (36%) (Tabla 6), pero animales más pesados, tales como los novillos, no están entre los animales muestreados en este frigorífico (0% novillos, dato no mostrado). Quizás por este motivo, este establecimiento mostró un significativo nivel de incidencia de los animales a la entrada de la línea de faena, ya que tenían en materia fecal un 6,7% (6/90). Además, a diferencia de los otros establecimientos de este estudio, el frigorífico G no tenía todavía un plan HACCP implementado ya que no exportaba a la Unión Europea y este establecimiento fue el que presentó mayor nivel de contaminación en las carcasas (11,1%, 10/90) y a su vez, aumentado significativamente con respecto a la contaminación de la MF.

Con respecto a la contaminación con EC O157 TSN en CA en los distintos establecimientos, 6 de los 9 frigoríficos participantes no tuvieron ningún aislamiento de este grupo. El frigorífico I que presentó el mayor porcentaje de EC O157 TSN en carcasas (4,8%), tuvo el mismo valor que a la entrada de la faena (4,8%) y coincidió que este frigorífico fue uno de los que presentó un aumento en la contaminación con STEC O157 con respecto al ingreso (Tabla 6).

Como ya se mencionó, la variabilidad en la contaminación de las carcasas puede ser afectada por diferentes factores operativos, como el diseño, la automatización y la velocidad de la faena, y otros como la capacitación del personal, la rotación y turnos de trabajo (Etcheverría y col., 2010). En nuestro país, es conocido que los diferentes niveles tecnológicos e higiénicos sanitarios a nivel de frigorífico, que implican la aplicación de normativas y sistemas de gestión de la calidad, más o menos exigentes en el proceso de faena,

se ven reflejados en la calidad microbiológica de las medias reses obtenidas (Lasta y col., 1992). Los frigoríficos participantes fueron habilitados para exportación y como se mencionó anteriormente, solo un establecimiento fue de producción mixta (Nacional y de exportación a Mercosur) y sin aplicación del sistema de calidad requerido para exportar, el frigorífico G, y fue el que justamente presentó un mayor nivel de contaminación en las canales. Por lo tanto, uno podría pensar que si se analizara de forma representativa la producción de carne para consumo interno, quizás los valores de incidencia encontrados a nivel de carcasas serían más elevado que los aquí presentados, ya que este valor es dependiente de la forma de operación de cada frigorífico que puede influir en los niveles de contaminación cruzada y en el estado microbiológico de las canales. Así lo muestra un estudio realizado en Australia que compara la calidad microbiológica entre diferentes tipos de establecimientos (Phillips y col.; 2001). Por lo tanto, las diferencias de contaminación de las carcasas con STEC O157 entre los diferentes establecimientos podrían estar reflejando una diferencia de inocuidad entre los estándares de producción nacional con los de exportación, por lo que sería interesante conocer el grado de contaminación en otros niveles tecnológicos de faena.

En lo que refiere a la diversidad y características de los aislamientos de *E. coli* O157 en animales, disponemos de muy poca información en nuestro país. Un estudio realizado en el año 2006, caracteriza fenotípica y genotípicamente, y compara las cepas aisladas de contenido fecal de bovinos con los aislamientos de agua de arroyos, de una estancia de Entre Ríos (Tanaro y col., 2010). La mayoría de los estudios describen la diversidad genética en los aislamientos clínicos (Rivas y col., 2006) o buscan comparar los aislados de alimentos con los agentes que producen enfermedad en seres humanos, es decir determinar el origen y la forma de transmisión (Rivas y col., 2003). En este trabajo, se evaluó la diversidad molecular de *E.*

*coli* O157 presente en ganado vacuno faenado en nuestro país y además disponer de la información obtenida como una herramienta epidemiológica.

La caracterización fenotípica sirvió para corroborar, por medio de métodos microbiológicos clásicos, que todos los aislamientos obtenidos en el presente estudio fueron cepas de *E. coli*, del serotipo O157 y que mayoritariamente tienen el antígeno flagelar H7. Por otra parte, todas las STEC O157 fueron sorbitol y  $\beta$ -glucuronidasa negativas como la mayoría de las *E. coli* O157:H7 (Ratnam y col, 1988), siendo estas características las utilizadas como estrategias de diferenciación en los medios de cultivos utilizados para su aislamiento (Schmidt y col., 1999). Además, casi todas las STEC O157 se correspondieron con el Biotipo C, el cual es el principal biotipo encontrado en nuestro país en las cepas circulantes productoras de SUH (Zotta y col., 2009). Todas las cepas aisladas expresaron fenotípicamente la citotoxicidad en células Vero y la mayoría fueron fenotípicamente productoras de enterohemolisina EHEC-Hly (74%), aunque todas contenían el gen *ehxA*. Estas dos características están relacionadas con la patogenicidad. Además, existe una estrecha relación (90%) entre la producción de toxina Shiga y de enterohemolisina, por lo cual se considera que la detección de EHEC-Hly puede ser un marcador epidemiológico útil para seleccionar probables cepas con mayor poder patogénico de STEC O157.

A pesar de que el uso de antibióticos como tratamiento terapéutico en la infección por STEC es controvertida porque ciertos antibióticos conducen a la mayor expresión de los genes de la toxina Shiga, y en otros casos se favorece la liberación de Stx en tracto intestinal (Galland y col., 2001), en este estudio se probó la susceptibilidad a antibióticos como parte de la caracterización de las cepas, y también, porque es importante conocer si los microorganismos aislados de animales desarrollan resistencia durante la producción ganadera. Los antimicrobianos utilizados en este trabajo son específicos contra *E. coli*, la mayoría de

uso humano aunque algunos también pueden ser utilizados en tratamientos para animales, sobre todo en sistemas de cría intensiva como promotores de crecimiento y con fines terapéutico. La mayoría de las STEC O157 (89%) del presente estudio fueron susceptibles al panel de antibióticos probados y por lo tanto este patrón de susceptibilidad no fue de utilidad para caracterizar la variabilidad de los aislamientos. Sin embargo, cuando se probó la susceptibilidad a antibióticos de las EC O157 TSN, se encontraron más cepas resistentes (38%) a uno o más de los 11 antibióticos utilizados. Conocer el patrón de resistencia de los aislamientos puede ser de utilidad para tratamientos futuros o para evitar el uso de esos antibióticos en la cría intensiva de animales (Scott y col., 2006).

La identificación de genes de virulencia en cepas de *E. coli* O157 ha llevado a una mejor comprensión de la patogénesis de las enfermedades diarreicas causadas por estos organismos y ha permitido una mayor caracterización pudiendo encontrarse patogrupos distintos dentro del serogrupo O157 (Ørskov y Ørskov, 1992). Cabe señalar que, además de la capacidad de producir toxina Shiga (codificado por el gen *stx*), la patogenicidad de las cepas de STEC está asociada a otros factores de virulencia, tales como aquellos que producen las lesiones de “*attachment and effacement*” generadas por la Intimina codificada por el gen *eae*, y la hemolisina codificada por el gen *ehxA* (Karmali, 2004), los cuales fueron investigados en este trabajo. En este estudio se encontró que todas las cepas de STEC O157 presentaban en su genotipo además del gen *o* de los genes de toxina Shiga, los otros factores de virulencia mencionados.

Dentro de los factores de virulencia, la toxina Shiga (Stx) es considerado el factor de virulencia crítico en las enfermedades producidas por STEC. Existen dos tipos de Stx, la toxina Stx1 y la Stx2 con sus diferentes variantes. Hay evidencias de una asociación entre la presencia de los genes *eae* y *stx*<sub>2</sub> con un mayor riesgo de desarrollar SUH y en los

aislamientos clínicos se considera una forma de predecir el desarrollo de la enfermedad. También es conocido que Stx2 es aproximadamente unas 1000 veces más tóxica que Stx1 para las células del endotelio microvascular renal humano (Boerlin y col., 1999). Por otra parte, estudios previos indican que el resultado clínico de la infección por STEC dependen del genotipo *stx* de la cepa infectante (Jelacic y col., 2003; Persson y col., 2007).

En nuestro estudio, todas las STEC O157 aisladas presentaban, además de los genes de virulencia *rfb*<sub>O157</sub>, *eae*, *ehxA* y *fliC*<sub>H7</sub>, el genotipo toxigénico más potente *stx*<sub>2</sub> y sólo nueve cepas presentaron además el gen *stx*<sub>1</sub> juntos. Cuando se analizaron las variantes toxigénicas, se encontró que la variante toxigénica predominante (56%) fue la *stx*<sub>2</sub>/*stx*<sub>2c(vh-a)</sub>, la cual también es la forma prevalente en más de un 90% de los casos de SUH posentérico de nuestro país (Leotta y col., 2008), coincidiendo además con el resultado de algunos estudios de otros países que indican que esta variante se asocia más frecuentemente a SUH que otros genotipos toxigénicos (Friedrich y col, 2002; Eklund y col., 2002).

En nuestro país, en un estudio realizado con D'Astek y col. (2012), donde se estudiaron los genotipos de virulencia de aislamientos clínicos obtenidos durante el mismo período de muestreo de nuestro trabajo, se encontró que el genotipo *stx* predominante en casos clínicos humanos también fue el *stx*<sub>2</sub>/*stx*<sub>2c(vh-a)</sub>, en un 76% de los casos, mientras que el segundo más importante fue el genotipo *stx*<sub>2</sub> (21%) que fue minoritario en los aislamientos bovinos, representando sólo el 9% de las cepas (Tabla 13). Mientras el genotipo *stx*<sub>2c(vh-a)</sub> se encontró en un 17% en bovinos en nuestro estudio, sólo se detectó en un 0,9% en humanos. También nosotros detectamos el genotipo *stx*<sub>1</sub>/*stx*<sub>2</sub>/*stx*<sub>2c(vh-a)</sub> en un 7% de los aislamientos, y en casos clínicos se detectó en un 3,2%. Por lo tanto, en base a la caracterización genotípica podemos confirmar que el ganado bovino representa un importante reservorio para el genotipo prevalente en la enfermedad humana.

Como ya se mencionó anteriormente, las *E. coli* O157:H7/NM *stx*-negativas cobraron importancia en los últimos años ya que existen algunos trabajos donde han sido recuperada de casos clínicos y también en brotes de diarrea, o colitis hemorrágicas y SUH (Friedrich y col., 2007; Mellmann y col., 2005). En estos casos las *stx*-negativas aisladas presentaban otros factores de virulencia acompañantes, tales como los genes *eae* o *hlyA*, y prácticamente no se diferenciaban genéticamente de las bacterias *stx*-positivas aisladas en el mismo brote, por lo que los investigadores concluyen que estas cepas surgieron de una pérdida de los genes *stx* de una STEC durante el curso de la enfermedad. Además, la capacidad de causar enfermedad no dependería solamente de la expresión de las toxinas Shiga, múltiples factores pueden jugar un rol en producir enfermedad, tales como los factores de virulencia adicionales, la dosis ingerida y el estado inmunológico del huésped (Koohmaraie y col., 2005). Por lo tanto, el hallazgo de cepas *stx*-negativas, inicialmente podría tener relevancia clínica. El presente estudio es la primera investigación sistemática de *E. coli* O157 no productoras de toxina Shiga, donde 48 cepas EC O157 TSN fueron aisladas y caracterizadas. En este trabajo los aislamientos mostraron características fenotípicas y genéticas diferentes a las STEC O157, excepto una cepa EC O157 TSN, la I-010, que si bien no presentó genes de toxina Shiga, mostró características comunes a las cepas toxigénicas tales como la fermentación de sorbitol y la producción de  $\beta$ -glucuronidasa negativas y también la presencia de factores de virulencia complementarios como la producción de Intimina y la Enterohemolisina (Tabla 11 y 13). Los genes *stx* pueden ser transmitidos entre cepas a través de fagos (Stephan y col., 2009) o bien pueden perderse durante una infección, o a través de múltiples cultivos (Bielaszewska y col., 2007; Mellmann y col., 2005), tal podría ser el caso de la cepa I-010 aislada de una carcasa, que sería una STEC O157 con un genotipo de “virulencia completa” que perdió los genes *stx*

durante su paso por el tracto digestivo del animal, pero esto no es posible de determinar en este estudio.

A pesar de haber aislado en este estudio un importante número de cepas EC O157 TSN (48), la pregunta que surge es cuál es la importancia de estas *E. coli* y si deben considerarse o no como un riesgo para la salud pública y qué significancia tiene su hallazgo en las determinaciones de rutina a nivel de frigorífico.

En un estudio de Galland y col. (2001) de prevalencia de *E. coli* O157:H7 en ganado en *feedlots*, de 57 aislamientos encontraron 31 cepas *stx*-negativas, las cuales tampoco presentaban genes *eae* y *hlyA*. Los autores destacaron la importancia de la determinación de los marcadores de virulencia para no sobrestimar la prevalencia de las *E. coli* O157 de importancia clínica. En otro estudio realizado por Stephan y col. (2009), encontraron una cepa *stx*-negativa aislada de bovino, en la cual sólo detectaron la presencia del gen de una fimbria polar larga de *E. coli* O157 (*lpfA*<sub>O157</sub>), siendo negativos los demás factores de virulencia estudiados. Esta cepa, además de ser FS, tuvo un espectro de genes de virulencia distintos, y también un origen filogenético diferente de aquellas cepas EHEC O157 de origen humano.

En el modelo evolutivo propuesto por Feng y col. (1998) para la emergencia de cepas patógenas de *E. coli* O157:H7, no contempla la existencia de las cepas de *E. coli* que expresan el antígeno O157 pero que no presentan la toxina Shiga. Probablemente las EC O157 TSN se aproximen más al antecesor O55:H7, Sor (+) y  $\beta$ -glu (+), *stx*-negativo (A1 de la Figura 3), pero este último, en el modelo propuesto, contiene la isla de patogenicidad LEE. En este trabajo, casi todas las cepas EC O157 TSN aisladas (menos una) no presentaron el gen *eae*, típico de las cepas EHEC u otros factores de virulencia como el plásmido del factor de adherencia de EPEC (pEAF), típicos de las cepas EPEC (Naylor y col., 2005). Por lo tanto, se

necesitaría continuar con los estudios de las EC O157 TSN aisladas para poder definir su significancia a nivel epidemiológico.

Con respecto a la subtipificación molecular, es conocido que el esquema de identificación por fagotipificación fue desarrollado por Ahmed y col., en 1987, y desde entonces junto con la serotipificación y luego con el PFGE, ha sido muy utilizado como técnica complementaria para la subtipificación de STEC O157 (Rivas y col., 2006). La tipificación por fagos en este trabajo, no mostró tanto poder discriminativo ya que de las 54 STEC analizadas, se determinaron 12 fagotipos, mientras por PFGE se determinaron 29 patrones por *Xba*I. Por lo tanto los patrones de PFGE no siempre se correlacionaron con los PT. Por ejemplo, el fagotipo PT2 se lo encontró en cepas que mostraron diferentes patrones de PFGE, sin embargo en casi todos los clusters encontrados por *Xba*I-PFGE presentaron el mismo PT por cluster, excepto el cluster III donde se encontró una cepa PT4 y otra no tipificable.

Los 12 fagotipos encontrados son conocidos y de estos, los predominantes (65% del total) fueron cuatro, PT2 (26%), PT39 (17%), PT4 y PT49 (11%). Estos fagotipos coinciden con tres de los fagotipos prevalentes encontrados en un estudio realizado por D'Astek y col. (2012) de aislamientos humanos obtenidos durante el mismo período de muestreo de este trabajo, los cuales fueron PT4 (38%), PT49 (24%) y PT2 (19%), que alcanzan el 80,5% de los aislamientos. Similarmente, en un estudio en Dinamarca (Roldgaard y col., 2004), donde compararon aislamientos de STEC O157 asociadas a enfermedad humana severa con los aislamientos de ganado vacuno, identificaron en la mayoría de los aislamientos humanos (87%) a los fagotipos PT2, PT4, PT8 y PT14, pero estos fagotipos sólo los encontraron en el 46% de los aislamientos bovinos siendo el fagotipo PT14 fue el prevalente en ganado (22%), mientras que en nuestro estudio no encontramos cepas del PT14. Por lo tanto, el ganado

vacuno sería el reservorio de estos fagotipos predominantes en las patologías humanas, además de reservorio para una mayor variedad de fagotipos.

La electroforesis de campo pulsado (PFGE) es el método de subtipificación más ampliamente usado. Desde su aparición, se ha utilizado para identificar fuentes de infección (alimentos, animales, personas, etc.) de pacientes en brotes o casos de SUH (Rivas y col., 2006). También se ha aplicado como una herramienta valiosa para rastrear la contaminación dentro de las plantas de producción de alimentos, y específicamente para STEC O157 en frigoríficos (Barkocy-Gallagher y col., 2001).

A pesar de las similitudes que presentan las cepas aisladas a nivel fenotípico e inclusive en su patogenicidad a nivel molecular, el PFGE es capaz de mostrar un grado considerable de heterogenicidad genética entre las cepas. De las 54 STEC O157 estudiadas, se determinaron 29 patrones de *Xba*I-PFGE diferentes, 21 de estos provenían de los aislamientos de MF y 14 de las muestras de carcasa, lo que significa que existen algunos casos donde coinciden los patrones de aislamientos de MF y CA, es decir que forman parte de algunos de los 11 clusters identificados.

A diferencia de un estudio realizado por Barkocy-Gallagher y col. (2001) en el que muchos subtipos o clusters fueron recuperados de un mismo lote; en este estudio, sólo un patrón de STEC O157 *Xba*I-PFGE se recuperó por lote contaminado en la mayoría de los casos (81%, 22/27). En sólo cinco oportunidades se encontraron dos patrones distintos para un mismo lote (lotes G-08, G-09, G-10, G-12 y D-05), cuatro de esos cinco casos provenían fueron muestras del frigorífico G que fue el que mostró mayor contaminación posproceso como ya se mencionó anteriormente.

También, de los 11 clusters obtenidos por *Xba*I-PFGE, hubo tres casos donde un mismo patrón se encontró en dos lotes, fueron los casos de los clusters IV, V y IX. En el caso del

cluster IV, presentó 3 cepas que provenían de lotes muy diferentes, una cepa provenía del lote A12 y las otras dos del lote E12. En este caso en particular, cuando se realizó la digestión con la segunda enzima (*BlnI*), se comprobó que la cepa que provenía del lote A12 tenía un perfil *BlnI*-PFGE diferente a las otras dos, y también presentó un genotipo toxigénico distinto. Este fue el único caso que la segunda enzima dió una diferencia con respecto a la digestión con *XbaI* (datos no mostrados).

En el caso de los clusters V y IX, lo que observamos es que las cepas provenían de muestras de carcasas tomadas en dos visitas consecutivas a un mismo frigorífico (I-01 e I-02, G-08 y G-09). Esto estaría indicando que, o bien las cepas soportaron las medidas de sanitización para lograr la eliminación de este agente patógeno, o bien que se trata de un patrón muy extendido en los animales faenados en ese frigorífico. Dado que las visitas fueron realizadas con aproximadamente un mes de diferencia al mismo frigorífico, estos microorganismos deberían resistir las condiciones ambientales de las plantas faenadoras.

Por otra parte, cuando analizamos la relación de la contaminación de los lotes a la entrada y la salida de la línea de faena (Tabla 8), observamos que de 20 lotes con MF contaminada a la entrada del frigorífico, la contaminación se redujo en un 65%, quedando sólo 7 lotes con al menos una carcasa positiva. Cuando comparamos el PFGE de estos 7 lotes (Figura 19), vemos que en 5 de los 7 casos, las cepas de STEC O157 aisladas de las carcasas eran idénticas por PFGE (100% de similitud) a las cepas del contenido fecal del mismo animal o de un bovino contiguo en el lote. Es decir que se corroboró que las STEC O157 que se encontraban en las heces contenidas en el intestino de los animales, llegaron al final del procesamiento, a la superficie de las canales.

También encontramos que un 5% de los lotes (7 lotes) presentaron contaminación en carcasa que no se detectó en MF en ningún animal muestreado de ese mismo lote (Tabla 8).

Cinco de estos 7 lotes, tiene patrones de *Xba*I-PFGE agrupados en clusters que contienen 2 o más cepas aisladas de CA de animales diferente pero de un mismo lote (cluster II, lote G-02) o de lotes consecutivos (Cluster V, lotes I-01 e I-02; cluster IX, lotes G-08 y G-09). Lo más probable es que la contaminación de las canales podría atribuirse a los cueros de los animales (no analizados en este estudio) o del contenido fecal de otros animales del mismo lote o de un lote anterior, no muestreados en este trabajo. Sin embargo, en algunos casos, las cepas con el mismo patrón se recuperaron de canales en diferentes visitas al mismo frigorífico, señalando la posibilidad de una fuente de contaminación más persistente.

Cuando se analiza la distribución animal por animal de la contaminación con STEC O157 (Tabla 9), se observa que el 94% de los animales muestreados son negativos y que el procesamiento de faena reduce en un 88% la contaminación de los animales que eran portadores a la entrada de la línea de faena. Sólo el 2% de los animales negativos a la entrada del procesamiento, presentaron contaminación de sus carcasas. Esto implicaría una contaminación cruzada del 2% durante el procesamiento.

Estos datos muestran que la mayor parte de la contaminación entrante con los animales no se transfirió a las carcasas durante la faena, pero que, a pesar de ello, existió contaminación cruzada de las canales en las plantas de faena. Varios mecanismos pueden ser responsables de la difusión de *E. coli* O157 durante el proceso. Puede ocurrir contaminación a través del contacto directo con el personal, los cuchillos u otros equipos utilizados. O bien, las canales pueden estar en contacto entre sí en la línea. Además, el agua y/o el aire pueden ser una fuente de transmisión (Elder y col., 2000). Algunas operaciones son más propensas a generar contaminación, como el eviscerado o el descuerado. Por otra parte, la variabilidad de la contaminación y de la contaminación cruzada, depende del diseño y tamaño de la planta, de las características de los equipos y su automatización, la velocidad de la masacre, entre otros

(Etcheverría y col., 2010). Sin embargo, el nivel de contaminación cruzada reportado en este estudio es más bajo que el 8% reportado por Chapman y col. (1993) en un estudio de prevalencia en un frigorífico en Inglaterra.

Por otra parte, aunque es conocido que los cueros de los animales son una fuente de contaminación directa con STEC durante la faena, su rol en la producción de carne en nuestro país, en virtud de las prácticas actuales de cría y de faena, requiere una mayor clarificación.

Finalmente, en vista de las altas tasas de casos de SUH en Argentina, es esencial identificar las probables fuentes de infección con STEC O157. Para ello, la comparación de los perfiles de *stx*-PFGE entre las cepas aisladas en los casos de SUH y los diferentes orígenes, es una herramienta valiosa. Como ya se mencionó anteriormente, en nuestro estudio, el genotipo prevalente (*stx*<sub>2</sub>/*stx*<sub>2c(vh-a)</sub>), coincidió con el predominante en los casos de SUH posentérico en la Argentina. Pero si además, comparamos los perfiles de PT-PFGE-*stx* de las cepas aisladas en este trabajo, con los perfiles PT-PFGE-*stx* identificados en 226 cepas aisladas a partir de casos clínicos producidos durante el mismo período de muestreo (D'Astek y col., 2012) y que se encuentran incluidos en la base de datos de *E. coli* O157 de la red PulseNet de Argentina, encontramos una marcada coincidencia de patrones de PT-PFGE-*stx* entre los aislamientos de la especie bovina y los recuperados de enfermedad humana. Estos patrones fueron: PT4-AREXH01.0011-*stx*<sub>2</sub>/*stx*<sub>2c(vh-a)</sub> (12 humanos y 1 bovino), PT4-AREXH01.0543-*stx*<sub>2</sub>/*stx*<sub>2c(vh-a)</sub> (1 humano y 4 bovinos), PT2-AREXH01.0076-*stx*<sub>2</sub>/*stx*<sub>2c(vh-a)</sub> (1 humano y 4 bovinos), PT49-AREXH01.0175-*stx*<sub>2</sub>/*stx*<sub>2c(vh-a)</sub> (7 humanos y 1 bovino), y PT49-AREXH01.0022-*stx*<sub>2</sub>/*stx*<sub>2c(vh-a)</sub> (7 humanos y 1 bovino). Por otra parte, de estos cinco patrones coincidentes en ambos orígenes, dos de ellos, el AREXH01.0011 y el AREXH01.0022, son los predominantes de acuerdo con la base de datos de *E. coli* O157 de nuestro país, comprendiendo un 30% de los aislamientos (Leotta y col., 2008). Esta coincidencia de

perfiles es un indicativo de que algunos patrones de STEC O157 parecen circular en el país y que el ganado constituye el principal reservorio en términos de infección humana. Sin embargo, algunos perfiles PT-PFGE-*stx* se encuentran exclusivamente en el reservorio bovino. Estos hallazgos son consistentes con la noción de que solo un subconjunto de STEC O157 de origen bovino está implicado en la enfermedad humana.

Con respecto a la subtipificación de las cepas EC O157 TSN, con el resultado del *Xba*I-PFGE, observamos que, por un lado las EC O157 TSN tiene mayor variabilidad que las STEC O157, ya que 48 cepas generan 34 patrones de PFGE con aproximadamente un 65% de similitud, mientras que las 54 cepas STEC generan solamente 29 patrones con 75% de similitud. También se observó que de los 8 clusters obtenidos en el dendograma de las cepas EC O157 TSN, sólo un cluster, tenía cepas aisladas de carcasas, los demás clusters pertenecían a aislamientos fecales. Además, por medio del PFGE de las EC O157 TSN, no se detectaron casos de transferencia de la contaminación desde la MF a las CA, ni de residencia de clones en algún establecimiento.

Además, las EC O157 TSN agrupadas en clusters provenían de muestras (sea de MF o de CA) de animales de un mismo lote. Al igual que con las STEC O157, encontramos que la contaminación de los lotes se presenta de forma aleatoria ya que la mayoría de los lotes son negativos tanto para STEC O157 como para EC O157 TSN (Tabla 7), sin embargo, algunos lotes particulares la contaminación alcanza hasta 5 de los 6 bovinos muestreados, y por la subtipificación corroboramos que en esos casos de alta contaminación, se trata del mismo clon circulante en la tropa (Figura 19 y 20).

Por otra parte, cuando se analiza la relación clonal por PFGE de las STEC O157 con las EC O157 TSN (Figura 21), vemos que las cepas no toxigénicas tendrían un origen filogenético diferente a las STEC O157, ya que en el árbol se observa que se agrupan

separadamente y el porcentaje de similitud entre ellas es de aproximadamente un 68%. Esta diferenciación sugiere que el origen de las cepas EC O157 TSN, difiere sustancialmente del linaje de las STEC O157, tanto a nivel fenotípico, molecular como en el análisis filogenético.

Solamente dos cepas TSN (I-010 y I-119) se relacionaron con mayor similitud al grupo de las STEC O157, coincidiendo con lo que ya se discutió en particular sobre la cepa I-010, que presentó un genotipo de virulencia similar a las STEC O157, además de ser la única del grupo *stx*-negativa que fue no fermentadora de sorbitol y  $\beta$ -glucoronidasa negativa. Esto corrobora la hipótesis de que la cepa I-010 habría sido una STEC O157 que perdió la toxina Shiga en algún evento desconocido.

Los resultados de caracterización de las cepas EC O157 TSN son coincidentes con un estudio realizado por Stephan y col. (2009) donde caracterizan y comparan tres aislamientos *stx*-negativos obtenidos de animales, una de las cepas presentaba características muy similares a las que se encontraron en este estudio (O157, H7, FS, *eae*<sup>-</sup>, *hlyA*<sup>-</sup>, entre otras), pero además, la subtipificación molecular realizada por MLST (*Multilocus sequence typing*), mostró que esta cepa no se relacionaba en base a su perfil alélico con ninguna de las otras dos cepas *stx*-negativas, *eae*-positivas estudiadas, ni tampoco tenían relación filogenética con una colección de cepas asociadas a SUH.

Por lo tanto, podría ser que las EC O157 TSN aisladas en este estudio representen un linaje de cepas *E. coli* O157 diferentes, presentes en ganado y que no implican un riesgo para la salud dado que hasta el momento no se han encontrado en nuestro país cepas *stx*-negativas asociada a casos clínicos. Sin embargo, su detección positiva de rutina, puede indicar un nivel mayor que el real de contaminación con *E. coli* O157 de animales o de lotes de animales de exportación, si se determinan por métodos inmunológicos de tamizaje basados únicamente en la detección del antígeno O157 tales como la aglutinación con látex (Galland y col., 2001),

ELISA, inmunocromatografías o las técnicas de inmunocaptura. De acuerdo con el USDA (2013), es motivo de rechazo encontrar una *E. coli* O157, con el antígeno H7, aunque no tenga toxina Shiga.

Sería importante investigar si hay relación de este grupo EC O157 TSN con el progenitor O55:H7 de las STEC O157, o si el grupo EC O157 TSN presenta otros rasgos de virulencia particulares, contenidos por cepas enteropatógenas no productoras de toxina Shiga, que sean importantes para conocer su papel en la evolución de estos patógenos.

Con respecto al tercer objetivo planteado en este trabajo de tesis, ya se mencionó inicialmente que la acidez gástrica es la primera línea de defensa para inactivar los patógenos transmitidos por alimentos. En consecuencia la capacidad de resistir la acidez gástrica estaría asociada con bajas dosis infectivas. Los datos epidemiológicos de brotes por *Escherichia coli* O157:H7 muestran que este patógeno presenta bajas dosis infectivas, lo que se correspondió con estudios *in vitro* donde se demostró su gran capacidad para soportar el paso a través del estómago y de resistir la acidez del jugo gástrico durante algunas horas (Arnold y Kaspar, 1995). Además, se ha comprobado la capacidad de *Escherichia coli* O157:H7 para sobrevivir en alimentos ácidos o de acidez moderada, la cual puede aumentar su posterior supervivencia a condiciones extremadamente ácidas (Leyer y col., 1995), condición conocida como adaptación ácida. Además, se conoce que estas bacterias han desarrollado al menos tres mecanismos diferentes de resistencia ácida (RA), dos sistemas aminoácido-descarboxilasa dependientes (Glutamato y Arginina, RA2 y RA3 respectivamente) y un sistema glucosa reprimido u oxidativo (RA1) (Richard y Foster, 2003; Large y col., 2005; Bearson y col., 2009). En el presente estudio, se probó la respuesta de resistencia ácida de cepas de *E. coli* O157 aisladas de bovinos con el objeto de conocer si esta respuesta le proporciona alguna variable diferencial asociada a la sobrevivencia del agente en condiciones ambientales

desfavorables. Se probó la RA de las cepas STEC O157 y EC O157 TSN por los tres mecanismos mencionados, y se encontró que para todas las cepas, el sistema RA2 fue el más protector a condiciones ácidas ya que casi no disminuye el recuento inicial de bacterias después de seis horas a pH 2, luego le sigue el sistema RA3 (pH de desafío 2,5) y por último el RA1 (pH de desafío 2,5), muy cercano al comportamiento del ensayo control. En un estudio realizado por Large y col. (2005), donde compararon la variación de la resistencia ácida entre tres clones de STEC (O157 y no-O157) y un grupo de cepas de *E. coli* comensales, también encontraron que el sistema glutamato dependiente resultó ser el que provee una mejor protección en condiciones extremadamente ácidas, donde para el grupo clonal de cepas STEC O157 obtuvieron una reducción logarítmica menor a 0,1 log, por hora a pH 2. En nuestro caso, si calculamos el NRL por hora, para el caso de las STEC O157 encontramos un valor promedio de 0,15. También, encontramos que las cepas EC O157 TSN son significativamente más resistentes que el grupo de las STEC O157 para los dos sistemas aminoácido-descarboxilasa dependientes (RA2 y RA3) (Tabla 16).

Un estudio realizado por Bergholz y Whittam (2007), para estudiar también la variación de la resistencia ácida de cepas EHEC, describe que no pudieron encontrar variaciones de resistencia ácida entre diferentes EHEC O157 y no-O157 en ensayo en medios mínimos como los utilizados en nuestro estudio. Sin embargo, cuando la respuesta al estrés ácido fue probada en ambientes gástricos simulados, las cepas EHEC O157 fueron dos veces más resistentes que las cepas EHEC no-O157 y esta resistencia, además, fue dependiente de una mayor expresión de la enzima Glutamato descarboxilasa, es decir que, aparentemente el principal mecanismo que interviene en la resistencia al paso por el trato gastrointestinal es el RA2.

Un estudio de Saridakis y col. (2004), sobre la influencia del origen (bovino, porcino o humano) en la sobrevivencia de *E. coli* O157:H7 en desafío ácido, encontró que la RA, sí depende

del linaje de origen. Ellos encontraron que las cepas de origen bovino resistían mejor el desafío ácido con HCl, mientras que las de origen porcino toleraban mejor el desafío con ácidos grasos volátiles. También, una investigación realizada por van Hoek y col. (2013), el cual estudió las variaciones en el comportamiento de cepas de *E. coli* O157 de diferentes orígenes (aislamientos bovinos, de alimentos y clínicos), encontró que hay diferencias significativas en la sobrevivencia a condiciones adversas de acuerdo con el origen de los aislamientos y que este comportamiento a su vez está correlacionado con la presencia de mutaciones a nivel del gen *rpoS*, ya que cepas aisladas de bovinos y de alimentos presentaban muy bajo número de mutantes *rpoS*, mientras que los aislamientos humanos tenían un número relativamente alto de mutantes. A su vez, la ausencia de mutaciones en el gen *rpoS*, proporcionaban una sobrevivencia a largo plazo (más de 200 días) en suelo suplementado con estiércol y también mayor porcentaje (>95%) de sobrevivencia en condiciones ácidas de fluido gástrico simulado (pH 2,5).

Por el contrario, en el presente estudio, sólo comparamos la variabilidad de respuesta al estrés ácido de los aislamientos de *E. coli* O157 obtenidos de los bovinos muestreados. Sería interesante a futuro, comparar con la resistencia ácida de aislamientos clínicos de STEC O157 y también de otras STEC no-O157, tanto en medios mínimos para ver cuáles son los mecanismos utilizados, como así también en ambientes gástricos simulados.

Con respecto a la variabilidad de la RA entre las cepas, cuando analizamos la distribución de frecuencias en la Figura 24, vemos que la distribución de la RA no es una distribución normal y que la respuesta es diferente de acuerdo con el mecanismo estudiado. Por un lado, vemos que la mayoría de las cepas estudiadas fueron sensibles a las condiciones ácidas si no utiliza ningún mecanismo de protección (ensayo Control). Por otro lado, la mayoría de las cepas utilizan el sistema RA2 y presentan condiciones de resistencia que denominamos

extremas, ya que sobreviven por 6 horas y prácticamente no disminuyen el número del inóculo inicial (<1 log). Como se mencionó anteriormente, el sistema oxidativo, no fue muy protectorio y se observa una gran cantidad de cepas sensibles a la acidez en este ensayo. Y con respecto al sistema dependiente de Arginina (RA3), es el que presenta mayor variabilidad entre cepas y se observa una diferencia entre la distribución de las cepas STEC O157 y las EC O157 TSN. Esta variabilidad entre cepas depende de una multiplicidad de factores propios de cada organismo y reflejan la diversidad propia del mundo microbiano natural, pero un estudio realizado por Whiting y Golden (2002), indican que es importante conocer esta variabilidad de respuesta para poder predecir o interpretar mejor el peligro potencial de un patógeno microbiano en un alimento.

Además, haciendo un ranking de resistencia ácida de las cepas, encontramos cuatro, dos STEC O157 y dos EC O157 TSN, que son significativamente más resistentes por los 3 mecanismos de RA estudiados. Y en particular, las dos cepas STEC O157, pertenecen al genotipo de virulencia preponderante en nuestro país, el *eae-ehxA-fliC<sub>H7</sub>-stx<sub>2</sub>/stx<sub>2c</sub> (vh-a)*. Tener cepas con estas características puede ser importante para realizar ensayos de inoculación en alimentos ácidos, en simulaciones del sistema gástrico, ya sea de animales o humanos, o para probar tratamientos con ácidos, donde se pueden utilizar una cepa con alta RA o un cóctel de cepas con diferentes respuesta de RA ya conocidas.

Una razón por la cual *E. coli* O157 presenta múltiples sistemas de RA es que los sistemas pueden actuar individualmente de acuerdo con el entorno de estrés ácido con el que se deban enfrentar. Price y col. (2004), probaron que tipo de sistema de RA utiliza este patógeno para sobrevivir en diferentes ambientes y encontraron que para sobrevivir en el tracto gastrointestinal bovino, que es sin duda un ambiente mucho más severo ya que el pH del abomaso se encuentra entre 2 a 2,5, las *E. coli* O157 utilizan el sistema RA2, mientras que en

sidra de manzana, que es menos severo con un pH 3,5; el sistema utilizado es el RA1. Esto es coincidente con los hallazgos de este trabajo, donde las cepas estudiadas, que provienen de bovinos, presentaron mayor resistencia por el sistema RA2.

Con respecto a la relación de la resistencia al estrés ácido de las cepas y el tipo de bovino de donde se aislaron, no encontramos ninguna relación entre la RA, ni con el sexo o raza de estos. Sólo se encontraron diferencias significativas de acuerdo con el tipo de sistema de cría de los animales (Estancia o Feedlot). En particular, para las STEC O157, se detectó que las cepas provenientes de animales de Estancia fueron significativamente más resistentes que las de animales de Feedlot por el sistema de RA dependiente de glutamato. Mientras que, las EC O157 TSN, mostraron ser más resistentes si provenían de estancia, por el mecanismo RA1, en cambio fueron más resistentes las de Feedlot por RA3. Estas diferencias encontradas, podrían estar relacionadas con el tipo de alimentación del ganado de acuerdo con el sistema de cría, donde por lo general los animales de Feedlot tienen una dieta a base de granos y los animales en estancias o fincas, son alimentados a pasto con una dieta mucho más rica en fibra. Algunos autores afirman que las dietas ricas en granos inducen un pH más bajo en el colon de los animales y que esto estimula la selección de bacterias más ácido resistentes en las heces de los animales alimentados a grano (Diez-González y col., 1998). Sin embargo, estas afirmaciones fueron rechazadas por Hove y col. (1999), quienes determinaron en un estudio que las *E. coli* O157 aislada de novillos, fueron resistentes a condiciones ácidas independientemente de las dietas de los animales, ya sean granos o pasto. De todas maneras, en nuestro estudio, solo conocemos la procedencia de los animales, pero no conocemos la composición de la dieta de cada grupo. Además, fue escaso el número de animales provenientes de feedlot en este trabajo, por lo tanto nuestros resultados de la relación entre la resistencia ácida con la procedencia de los animales no fueron concluyentes.

Los factores de virulencia que presentan y caracterizan los aislamientos son rasgos muy importantes para el establecimiento de la infección y la enfermedad. La resistencia ácida también se considera como un rasgo crítico de virulencia por el cual los patógenos resisten el paso por el tracto digestivo y presentan una dosis infecciosa baja (Price y col., 2004). En este estudio, comparamos los genotipos de virulencia que caracterizaban los aislamientos con la respuesta de resistencia ácida. Solamente el perfil denominado V10, que corresponde a cepas EC O157 TSN sin ninguna característica más que la de tener el lipopolisacárido O157, fue significativamente más resistente por los sistemas de resistencia RA2 y RA3, que los otros perfiles de virulencia. Pero no podemos concluir que los diferentes perfiles genéticos de virulencia de los aislamientos influenciaron de alguna manera la respuesta de RA obtenida. Esto es coincidente con lo expresado por Saridakis y col. (2004), que indicaban que no había ninguna relación entre la presencia de los genes *stx* en *E. coli* O157:H7 y su resistencia ácida. Sin embargo, algunos estudios indican que el estrés ácido induce cambios en la expresión de los diferentes factores de virulencia de las STEC O157. House y col. (2009), estudio la expresión diferencial de genes implicados en la virulencia luego de someter a condiciones de adaptación y desafío ácido a cepas de *E. coli* O157:H7 y encontró que el estrés ácido aumenta la adhesión epitelial, la motilidad y también la inducción bacteriana de apoptosis de las células huésped. También, Vanaja y col. (2010), estudió la expresión diferencial de genes de virulencia y de genes relacionados con el estrés de acuerdo con el origen de los aislamientos clínicos o bovinos. Ellos determinaron que, genes de importantes factores de virulencia de O157, como el locus LEE, Enterohemolisina y varios genes del plásmido pO157, tienen una mayor expresión en los aislamientos clínicos que en los de origen animal. Por el contrario, los genes esenciales para la resistencia ácida y adaptación al estrés, se encuentran sobreexpresados en las cepas de origen bovino, y esta mayor expresión la confirmaron con ensayos *in vitro* de

RA en modelos gástricos sintéticos. Probablemente esta característica de mayor expresión de la resistencia al ácido le permita a las *E. coli* O157 la mejor colonización de los animales.

En el presente trabajo, caracterizamos fenotípicamente la respuesta al estrés ácido de las cepas *E. coli* O157 aisladas de bovinos. En general encontramos una mayor resistencia de las cepas no productoras de toxina Shiga en los mecanismos de RA ensayados, y todas las cepas fueron más resistentes mediante el sistema RA2, conocido como el mecanismo utilizado por los microorganismos para sobrevivir en el sistema digestivo de los vacunos. Sin embargo, desconocemos si estas diferencias se deben a una mayor o menor expresión de genes, o bien, a la presencia o ausencia de genes o de mutaciones de genes, relacionados con la respuesta al estrés.

## 6. CONCLUSIONES

6.1. Este trabajo describe y cuantifica la contaminación de *E. coli* O157 existente en ganado de carne en las condiciones de producción entre el año 2006 al 2008 de la industria frigorífica de Argentina.

6.1.1. Se estableció la prevalencia de este patógeno de forma representativa a la entrada y a la salida de la línea de faena, de forma sistemática, uniforme y empleando una metodología robusta y sensible para la toma y análisis de las muestras.

6.1.2. El grado de portación de STEC O157 en bovinos al inicio de la faena, medida en contenido fecal, fue del 4,1%. A pesar de la dificultad de realizar comparaciones entre estudios de distintos países y años, debido a factores como metodología, estacionalidad, tipo de bovinos, entre otros, se puede decir el valor de prevalencia hallado, se encuentra dentro del rango de los valores de prevalencia reportados internacionalmente.

6.1.3. Se determinó un 4,7% de contaminación con EC O157 TSN en materia fecal de bovinos.

6.1.4. Si bien se observó una incidencia mayor de STEC O157 y de EC O157 TSN en terneros y vaquillonas, no fue posible tener certeza estadística del efecto de factores como el mes del año, estacionalidad, tipo de animal o sistema de cría, sobre la portación.

6.1.5. Se observó una mayor prevalencia de STEC O157 en primavera (5,7%), y de EC O157 TSN en invierno (13,2%). Estos resultados deben considerarse con cautela ya que pueden estar influenciados por factores propios del origen de los animales y también por la variación de las condiciones climáticas en las estaciones.

6.1.6. Es destacable la aleatoriedad observada de la contaminación en materia fecal con STEC O157 de los lotes de animales, donde la mayoría resultaron negativos (86%) en el

análisis, pero esporádicamente se presentaron lotes con una alta contaminación, hasta con 5 de 6 animales muestreados.

6.1.7. El ganado estudiado provino de 9 provincias con mayor relevancia en la producción ganadera de nuestro país y en particular de la provincia de Buenos Aires provino el 42% de los animales muestreados en este estudio. Por lo tanto, en la distribución geográfica de la prevalencia en contenido fecal de STEC O157, Buenos Aires tuvo un valor similar a la prevalencia global (4%). Sin embargo, hubo 3 provincias (Corrientes, Entre Ríos y Santiago del Estero) que mostraron mayor incidencia de los animales en pie. Esto podría deberse a las diferencias climáticas entre las distintas regiones del país, o al tiempo y la forma de traslado de los animales desde su lugar de origen hasta los frigoríficos, o por la misma aleatoriedad de la contaminación en las tropas.

6.1.8. El grado de contaminación de las carcasas con STEC O157 reportado aquí fue de 2,6% y se encuentra dentro del rango de valores reportados de distintos países.

6.1.9. La incidencia reportada en carcasas, es el promedio de todos los frigoríficos analizados, pero la contaminación varía entre ellos, desde 0 al 11%. Cabe destacar que los frigoríficos participantes en este estudio estaban habilitados para exportación y, en general, son de la más alta capacidad tecnológica. Sin embargo, en 3 de los 9 frigoríficos, la contaminación fue mayor a la salida de la línea de faena, que a la entrada.

6.1.10. El frigorífico G fue el de mayor contaminación en las carcasas (11%), y en particular este establecimiento era de producción mixta, tenía una importante producción para consumo interno y de exportación en el Mercosur, pero como no exportaba para la Unión Europea, no tenía implementado un sistema HACCP. Por lo tanto, las diferencias en la contaminación de las carcasas de los establecimientos participantes, podrían estar

reflejando las diferencias de inocuidad a nivel de la producción de carne para mercado interno y de exportación.

Sería necesario establecer cómo las condiciones de producción de carcasas en frigoríficos con menores niveles tecnológicos de faena y distinta composición de la hacienda, especialmente en aquellos dedicados a la producción para consumo interno, pueden aumentar la prevalencia de STEC O157 en la producción de carne.

6.2. Se caracterizaron todos los aislamientos obtenidos feno y genotípicamente para conocer su potencial patogénico y sus características epidemiológicas.

6.2.1. Todas las STEC O157 fueron *E. coli* O157:H7, Sorbitol y  $\beta$ -glucuronidasa negativas y casi todas del biotipo C. También, las cepas aisladas expresaron fenotípicamente citotoxicidad en células Vero y la mayoría expresaron la producción de Enterohemolisina. La mayoría de las STEC O157 (89%) fueron susceptibles al panel de antibióticos probados.

6.2.2. Por el contrario, todas las cepas EC O157 TSN fueron Sorbitol y  $\beta$ -glucuronidasa positivas (excepto la cepa I-010), y ninguna expresó citotoxicidad en células Vero, ni expresaron Enterohemolisina. El 38% de estas cepas fueron resistentes a uno o más de los antibióticos probados.

6.2.3. Las STEC O157 aisladas presentaban los genes de virulencia *rfb*<sub>O157</sub>, *eae*, *ehxA* y *fli*<sub>C<sub>H7</sub></sub>, y el genotipo toxigénico predominante (56%) fue el *stx*<sub>2</sub>/*stx*<sub>2c(vh-a)</sub>, el cual también es el más relevante de los casos de SUH posentérico de nuestro país. Por lo tanto, el ganado bovino sería uno de los reservorios de STEC O157 del genotipo prevalente en la enfermedad humana.

- 6.2.4. Se encontró solo una cepa EC O157 TSN aislada de carcasa, denominada I-010, que fue sorbitol y  $\beta$ -glucoronidasa negativa y que genotípicamente presentó los genes de virulencia *rfb*<sub>O157</sub>, *eae*, *ehxA* y *fliC*<sub>H7</sub>. Esta cepa podría ser una STEC O157 que perdió por alguna circunstancia el o los genes *stx*, y podría considerarse como una cepa que puede transformarse en “potencialmente patógena” si por algún fenómeno de transferencia adquiere algún gen *stx*.
- 6.2.5. Con respecto a las EC O157 TSN aisladas en este trabajo, representan un linaje de cepas diferentes a las STEC O157, el cual se encuentra en ganado bovino y hasta el momento no se comprobó que impliquen un riesgo para la salud en nuestro país. Sin embargo, la detección positiva de *E. coli* O157:H7 no productora de toxina Shiga, podría aumentar el rechazo de carne para exportación.
- 6.2.6. De los 12 fagotipos determinados de las STEC O157, hubo cuatro predominantes que fueron el PT2, PT39, PT4 y PT49, que coinciden con fagotipos prevalentes en aislamientos humanos de nuestro país.
- 6.2.7. Para STEC O157 se obtuvieron 29 patrones de *Xba*I-PFGE, entre los cuales, 11 se agruparon en clusters. En general se encontró un patrón por lote contaminado, solo en cinco lotes se encontraron dos patrones diferentes por cada lote. Dentro de los 11 clusters, hubo dos (V y IX) con cepas aisladas de carcasas de dos visitas consecutivas a dos frigoríficos, lo cual denota que existe una fuente de contaminación persistente en estos establecimientos (Frigoríficos G e I).
- 6.2.8. En la mayoría de los casos (65%), los lotes contaminados con STEC O157 a la entrada de la línea de faena, se encontraron sin contaminación en las carcasas. Sin embargo, hubo algunos casos donde las cepas aisladas de carcasa fueron idénticas por PFGE a las STEC

O157 aisladas del contenido fecal del mismo animal o de otro animal del mismo lote. Es decir que la contaminación a la entrada de la faena persiste hasta las canales.

También hubo lotes con contaminación en carcasas en los que no se detectó contaminación en la materia fecal de ninguno de los animales muestreados del mismo lote.

6.2.9. Se mostró que la contaminación con STEC O157, ya sea de heces o carcasas, estuvo concentrada en casi el 6% de los animales. La contaminación al ingreso de la línea se trasfiere a un 2% como contaminación cruzada.

Sería importante estudiar las fuentes de contaminación cruzada más relevantes que se pueden encontrar en los establecimientos de faena, ya sean por transmisión indirecta desde las superficies inertes por las operaciones propias de faena, o por las aguas residuales, como así también la relevancia de otras fuentes de transmisión directa como la contaminación de los cueros de los animales. De esta forma se podrían implementar intervenciones puntuales tendientes a reducir la presencia de este patógeno dentro de las plantas frigoríficas.

6.2.10. Se encontró una marcada coincidencia entre los patrones PT-PFGE-*stx* entre los aislamientos de STEC O157 recuperados de la especie bovina en este trabajo y los identificados a partir de casos clínicos que se encuentran incluidos en la red PulseNet de Argentina. Fueron cinco los patrones coincidentes en ambos orígenes, de los cuales, dos son los predominantes en la base de datos, lo cual indicaría que el ganado constituiría el principal reservorio para la infección humana de estos patrones de *E. coli* O157:H7 productoras de toxina Shiga que circulan en el país.

6.2.11. Con respecto a la subtipificación molecular de las EC O157 TSN, se establecieron 29 patrones de *Xba*I-PFGE, con 8 clusters. No se detectó con esta metodología transferencia

de la contaminación del contenido fecal a las carcasas. Los clusters fueron de aislamientos que provenían de animales de un mismo lote.

Por lo tanto, se corroboró por PFGE la aleatoriedad de la contaminación ya que se encontraron pocas tropas altamente contaminadas con un mismo clon (PFGE con 100% de similitud) de EC O157 TSN, al igual que en el grupo de STEC O157.

6.2.12. Se estableció a través de la subtipificación molecular de los aislamientos, que las EC O157 TSN tendrían un origen filogenético diferentes a las STEC O157. Las EC O157 TSN parecen representar un linaje diferente que no implica riesgo para la salud pero que se encuentra presente en el ganado vacuno de nuestro país. Sería interesante investigar qué papel cumple este grupo en la evolución de la STEC O157 típicamente patógena.

6.3. Se caracterizó fenotípicamente la respuesta al estrés ácido de las cepas *E. coli* O157 aisladas de bovinos.

6.3.1. Se cuantificó la respuesta de resistencia ácida (RA) por tres de los mecanismos conocidos, que son utilizados por las bacterias para sobrevivir a condiciones ácidas, el sistema oxidativo (RA1), el sistema Glutamato dependiente (RA2) y el sistema dependiente de Arginina (RA3). Se encontró que los sistemas que proveen más resistencia ácida fueron el RA2 seguido por RA3 y el menos protector fue RA1.

6.3.2. Se encontró que las cepas EC O157 TSN fueron significativamente más resistentes a las condiciones de desafío que las STEC O157 por los sistemas RA2 y RA3. Sin embargo, existe una gran variabilidad de la resistencia ácida entre cepas de ambos grupos, de acuerdo con el mecanismo participante, encontrándose cepas extremadamente resistentes por RA2 y una gran cantidad de cepas sensibles por RA1. El sistema RA3 es el que presentó una mayor variabilidad de respuesta entre cepas. Conocer esta

variabilidad en la respuesta al estrés ácido, es importante para predecir el comportamiento de este microorganismo.

Dentro del ranking de resistencia ácida de las cepas, se encontraron dos cepas STEC O157 y dos EC O157 TSN que son significativamente más resistentes que el resto, por los tres sistemas estudiados, las cuales se podrían utilizar en estudios posteriores.

6.3.3. Se determinó que puede haber alguna influencia del sistema de cría de los animales de donde se tomaron los aislamientos, con la respuesta de RA de las cepas. Esta influencia podría estar relacionada con el tipo de alimentación del ganado de acuerdo con el sistema de cría. Este tema sería interesante de analizar en estudios posteriores.

No se encontró ninguna relación entre la RA y el tipo de bovino, ni con el sexo o la raza de los animales muestreados.

6.3.4. Finalmente, estudiamos la relación entre los perfiles genéticos de virulencia y la resistencia ácida de las cepas, y en general se observó una mayor resistencia de las cepas *E. coli* O157 no productoras de toxina Shiga, por los sistemas aminoácido-dependientes. Sin embargo, nuestros resultados no fueron concluyentes respecto a los otros perfiles de virulencia analizados.

En conclusión, este trabajo realiza un aporte importante al cuantificar y caracterizar la contaminación con STEC O157 en ganado bovino de la Argentina, y sirve como una primera línea de base representativa de la prevalencia de este patógeno, la cual puede ser utilizada para estimar la probabilidad de infección en sistemas de evaluación de riesgo. En un primer análisis, los valores de prevalencia aquí reportados, no parecen justificar por sí mismos las inusualmente altas tasas de SUH de nuestro país; sin embargo, a través de las herramientas de epidemiología molecular empleadas, se pudo establecer que el ganado bovino constituye el un

importante reservorio de los clones prevalente de STEC O157:H7 que producen enfermedad humana en Argentina. Como continuidad de este trabajo, sería importante profundizar la significación de factores particulares como tipo de animales, época del año, dietas, en la prevalencia, ya que estos factores podrían asociarse al aumento o disminución del riesgo. Por ejemplo, el tipo de animal faenado para consumo local es preferiblemente el de menor edad. Otro ejemplo, es el cambio de dietas y sistemas de cría, que en general han evolucionado al mayor predominio del feedlot en los últimos años.

Con respecto al impacto de este trabajo en la producción e industrialización de la carne, se puede decir que como resultado del estudio, se cuenta con información confiable del estado de situación de este patógeno en una etapa de producción de carne en frigoríficos, especialmente de exportación. Estos datos pueden servir como información para las autoridades regulatorias de Argentina en la tarea de mejorar las condiciones de producción de carne. Sin embargo, se requerirían de otros estudios complementarios respecto de la incidencia de *E. coli* O157:H7 en la producción para consumo interno, ya que en este trabajo se esbozó que, la diferencia en los estándares de calidad aplicados en los frigoríficos de producción nacional y/o el tipo de hacienda faenada para consumo local, podría incidir en el nivel de contaminación con STEC O157 de las canales producidas.

Por otra parte, es relevante contar con la información sobre la variabilidad de la respuesta al estrés ácido de las cepas *E. coli* O157 del reservorio bovino de Argentina, ya que esta información es útil para la mejor predicción del comportamiento de estos microorganismos y para el diseño de diferentes estrategias de intervención, o puntos de control tendientes a reducir el nivel de contaminación en la producción industrial de carne. Dentro de las estrategias de control en planta se destaca, precisamente, el uso de ácidos orgánicos,

permitidos por el USDA desde hace varios años, y aceptado recientemente por la Unión Europea. En este sentido, en el estudio se identificaron cepas de STEC O157:H7 y de *E. coli* O157 TSN, significativamente resistentes a condiciones ácidas extremas que podrían ser utilizadas en ensayos de desafío o en ensayos de validación de la aplicación de ácidos como forma de control.

## 7. REFERENCIAS

1. Abe A, Heczko U, Hegele RG, Finlay BB. Two enteropathogenic *Escherichia coli* type III secreted proteins, Esp A and Esp are virulence factors. *J Exp Med.* 1998; 188: 1907-16.
2. Ahmed RC, Bopp C, Borczyk A. Phage-typing scheme for *Escherichia coli* serotype O157:H7. *J Infec Dis.* 1987; 155: 806-809.
3. Arnold KW, Kaspar CW. Starvation- and stationary-phase-induced acid tolerance in *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol.* 1995; 61: 2037-2039.
4. Arthur TM, Bosilevac JM, Nou X, Shackelford SD, Wheeler TL, Kent MP, Jaroni D, Pauling B, Allen DM, Koohmaraie M. *Escherichia coli* O157 prevalence and enumeration of aerobic bacteria, enterobacteriaceae, and *Escherichia coli* O157 at various steps in commercial beef processing plants. *J Food Prot.* 2004; 67 (4): 658-665.
5. Ayaz ND, Gencay YE, Erol I. Prevalence and molecular characterization of sorbitol fermenting and non-fermenting *Escherichia coli* O157:H7+/H- isolated from cattle at slaughterhouse and slaughterhouse wastewater. *Int J Food Microbiol.* 2014; 174: 31-38.
6. Barkocy-Gallagher GA, Arthur TM, Siragusa GR, Keen JE, Elder RO, Laegreid WW, Koohmaraie M. Genotypic analyses of *Escherichia coli* O157:H7 and O157 nonmotile isolates recovered from beef cattle and carcasses at processing plants in the Midwestern states of the United States. *Appl Environ Microbiol.* 2001; 67: 3810-3818.
7. Barkocy-Gallagher GA, Arthur TM, Rivera-Betancourt M, Nou XW, Shackelford SD, Wheeler TL, Koohmaraie M. Seasonal prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, including O157 and non-O157 serotypes, and *Salmonella* in commercial beef processing plants. *J Food Prot.* 2003; 66 (11): 1978-1986.
8. Bearson BL, Lee IS, Casey TA. *Escherichia coli* O157:H7 glutamate- and arginine-dependent acid-resistance systems protect against oxidative stress during extreme acid challenge. *Microbiol.* 2009; 155: 805-812.
9. Benjamin MM, Datta AR. Growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 under acidic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 1995; 61 (4): 1669-1672.
10. Berends IMGA, Graat EAM, Swart WAJM, Weber MF, van de Giessen AW, Lam TJGM, Heuvelink AE, van Weering HJ. Prevalence of VTEC O157 in dairy and veal herds and risk factors for veal herds. *Prevent Vet Med.* 2008; 87: 301-310.
11. Bergholz TM, Whittam TS. Variation in acid resistance among enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in a simulated gastric environment. *J Appl Microbiol.* 2007; 102: 352-362.
12. Berry ED, Cutter CN. Effects of acid adaptation of *Escherichia coli* O157:H7 on efficacy of acetic spray washes to decontaminate beef carcass tissue. *Appl Environ Microbiol.* 2000; 66 (4): 1493-1498.
13. Bertin Y, Boukhors K, Pradel N, Livrelli V, Martin C. Stx2 subtyping of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle in France: detection of a new Stx2 subtype and correlation with additional virulence factors. *J Clin Microbiol.* 2001; 39:3060-3065.
14. Besser RE, Lett SM, Weber JT, Doyle MP, Barret TJ, Wells JW, Griffin PM. An outbreak of diarrhea and hemolytic uremic syndrome from *Escherichia coli* O157:H7 in fresh-pressed apple cider. *J. Am. Med. Assoc.* 1993; 269: 2217-2220.
15. Beutin L, Montenegro MA, Ørskov I, 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: 2559-64.
16. Bielaszewska M, Köck R, Friedrich AW. Shiga toxin-mediated hemolytic uremic syndrome: time to change the diagnostic paradigm? *PLoS ONE.* 2007; 10; 2 (10): 1024.

17. Boerlin P, McEwen SA, Boerlin-Petzold F, Wilson JB, Johnson RP, Gyles CL. Associations between virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and disease in humans. *J Clin Microbiol.* 1999; 37: 497-503.
18. Bonardi S.; Maggi, E.; Pizzin, G.; Morabito, S.; Caprioli, A. Faecal carriage of Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 and carcass contaminations in cattle at slaughter in northern Italy. *Int J Food Microbiol.* 2001; 66: 47-53.
19. Brichta-Harhay DM, Guerini MN, Arthur TM, Bosilevac JM, Kalchayanand N, Shackelford SD, Wheeler TL, Koohmaraie M. *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 contamination on hides and carcasses of cull cattle presented for slaughter in the United States: an evaluation of prevalence and bacterial loads by Immunomagnetic Separation and direct plating methods. *Appl Environ Microbiol.* 2008; 74 (20): 6289-6297.
20. Brusa V, Aliverti V, Aliverti F, Ortega EE, de la Torre JH, Linares LH, Sanz ME, Etcheverría AI, Padola NL, Galli L, García PP, Copes J, Leotta GA. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef retail markets from Argentina. *Front Cell Infect Microbiol.* 2013; 2 (171): 1-6.
21. Buchanan RL, Edelson SG. Culturing Enterohemorrhagic *Escherichia coli* in the presence and absence of glucose as a simple means of evaluating the acid tolerance of stationary phase cells. *Appl Environ Microbiol.* 1996; 62: 4009-4013.
22. Buchanan RL, Edelson SG. pH-Dependent stationary-phase acid resistance response of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in the presence of various acidulants. *J Food Prot.* 1999; 62 (3): 211-218.
23. Bürk C, Dietrich R, Açar G, Moravek M, Bülte M, Märtlbauer E. Identification and Characterization of a new variant of Shiga toxin 1 in *Escherichia coli* O157:H7 of bovine origin. *J Clin Microbiol.* 2003; 4: 2106–2112.
24. Calderwood SB, Acheson DWK, Keusch GT, Barrett TJ, Griffin PM, Strockbine NA, Swaminathan B, Kaper JB, Levine MM, Kaplan BS, Karch H, O'Brien AD, Obrig TG, Takeda Y, Tarr PI, Wachsmuth IK. Proposed new nomenclature for SLT (VT) family. *ASM News.* 1996; 62:118-119.
25. Calletti MG, Petetta D, Jaitt M, Casaliba S, Giménez A. Evaluación de costos directos e indirectos del tratamiento del Síndrome urémico hemolítico en sus distintas etapas evolutivas. *Medicina.* 2006; 66 (supl.): 22-26.
26. Caprioli A, Morabito S, Brugère H, Oswald E. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. *Vet Res.* 2005; 36: 289-311.
27. Cassin MH, Lammerding AM, Todd ECD, Ross W, McColl RS. Quantitative risk assessment for *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef hamburgers. *Int J Food Microbiol.* 1998; 41: 21-44.
28. Castanie-Cornet MP, Penfoun TA, Smith D, Elliott JF, Foster JW. Control of acid resistance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 1999; 181 (11): 3525-3535.
29. Cavalieri SJ, Bohach GA, Snyder IS. *Escherichia coli*  $\alpha$ -hemolysin: Characteristics and probable role in pathogenicity. *American Society Microbiol.* 1984; 48(4): 326-343.
30. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). National Enteric Disease Surveillance: Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) Annual Report, 2011. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC, 2011.
31. Chapman PA, Siddons CA, Wright DJ, Norman P, Fox J, Crick E. Cattle as a possible source of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 infections in man. *Epidemiol Infect.* 1993; 111: 439-447.

32. Chapman PA, Cerdán Malo AT, Ellin M, Ashton R, Harkin. *Escherichia coli* O157 in cattle and sheep at slaughter, on beef and lamb carcasses and in raw beef and lamb products in South Yorkshire, UK. *Int J Food Microbiol.* 2001; 64 (1-2): 139-150.
33. Cheville AM, Arnold, KW, Buchrieser C, Cheng CM, Kaspar CW. rpoS regulation of acid, heat, and salt tolerance in *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol.* 1996; 62: 1822-1824.
34. Chinen I, Tanaro E, Miliwebsky E, Lound HL, Chilemi G, Ledri S, Baschkier A, Scarpin M, Manfredi E, Rivas M. Isolation and characterization of *Escherichia coli* O157:H7 from retail meats in Argentina. *J Food Prot.* 2001; 64: 1346-1351.
35. Chinen I, Epszteyn S, Melamed CL, Aguerre L, Martínez Espinosa E, Motter MM, Baschkier A, Manfredi E, Miliwebsky E, Rivas M. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 in beef and chicken burgers, and chicken carcasses in Buenos Aires, Argentina. *Int J Food Microbiol.* 2009; 132: 167-171.
36. Clinical and laboratory Standards Institute. Performance Standards for antimicrobial Disk and dilution susceptibility test for bacteria isolated from animals; Approve Standard (3th edition). CLSI document M31-A3. Pensilvania, USA. 2003.
37. Cobbold RN, Hancock DD, Rice DH, Berg J, Stilborn R, Hovde CJ, Besser, TE. Rectoanal junction colonization of feedlot cattle by *Escherichia coli* O157:H7 and its association with supershedders and excretion dynamics. *Appl Environ Microbiol.* 2007; 73 (5): 1563-1568.
38. Cummins E, Nally P, Butler F, Duffy G, O'Brien S. Development and validation of a probabilistic second-order exposure assessment model for *Escherichia coli* O157:H7 contamination of beef trimmings from Irish meat plants. *Meat Sci.* 2008; 79: 139-154.
39. D'Astek BA, Del Castillo LL, Miliwebsky E, Carbonari C, Palladino PM, Deza N, Chinen I, Manfredi E, Leotta GA, Masana MO, Rivas M. Subtyping of *Escherichia coli* O157:H7 strains isolated from human infections and healthy cattle in Argentina. *Foodborne Pathog Dis.* 2012; 9 (5): 457-464.
40. Dean AG, Sullivan KM, Soe MM. OpenEpi: Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health. 2004; Version 2.3. Disponible en: <http://www.OpenEpi.com> [Online].
41. Dean-Nystrom EA, Bosworth BT, Cray WC Jr, Moon HW. Pathogenicity of *Escherichia coli* O157:H7 in the intestines of neonatal calves. *Infect Immun.* 1997; 65: 1842-1848.
42. De Grado M, Abe A, Gauthier A, Steele-Mortimer O, DeVinney R, Finlay BB. Identification of the intimin binding domain of Tir of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol.* 1999; 1: 7-17.
43. Del Castillo LL, Miliwebsky E, Rodríguez RH, Masana MO. Tolerancia ácida de *E. coli* productor de toxina Shiga de diferentes orígenes. Congreso Argentino de Microbiología, 2004, Resumen L557. Buenos Aires, Argentina.
44. Díaz S, Vidal D, Herrera-Leon S, Sánchez S. Sorbitol fermenting,  $\beta$ -Glucuronidasa-positive, Shiga toxin-negative *Escherichia coli* O157:H7 in free-ranging red deer in Shouth-Central Spain. *Foodborne Pathog Dis.* 2011; 8 (12): 1313-1315.
45. Diez-González F, Callaway TR, Kizoulis MG, Russell JB. Grain feeding and the dissemination of acid-resistance *Escherichia coli* form cattle. *Science.* 1998; 281: 1666-1668.
46. Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStat versión 2014. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Disponible en: <http://www.infostat.com.ar>.
47. Doughty S, Sloan J, Bennet-Wood V, Robertson M, Robins-Browen RM, Hartland EL. Identification of a novel fimbrial gene cluster related to long polar fimbriae in locus of

- enterocyte effacement-negative strains of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun*. 2002; 70: 6761-6769.
48. Doyle MP, Zhao T, Meng J, Zhao S. *Escherichia coli* O157:H7. En: Doyle, M. P.; Beuchat, L. R.; Montville, T. (Eds), *Food Microbiology-Fundamentals and Frontiers*. Washington, DC, ASM Press, 1997, p. 171-191.
  49. Duffy G, Cummins E, Nally P, O'Brien S, Butler F. A review of quantitative microbial risk assessment in the management of *Escherichia coli* O157:H7 on beef. *Meat Sc*. 2006; 74: 76-88.
  50. Dytoc MT, Ismaili A, Philpott DJ, Soni R, Brunton JL, Sherman PM. Distinct binding properties of eaeA-negative verocytotoxin-producing *Escherichia coli* of serotype O113:H21. *Infect Immun*. 1994; 62:3494-3505.
  51. Edwards RA, Puente JL. Fimbrial expression in enteric bacteria: a critical step in intestinal pathogenesis. *Trends Microbiol*. 1998; 6: 282-287.
  52. Eklund M, Leino K, Siitonen A. Clinical *Escherichia coli* strains carrying *stx* genes: *stx* variants and *stx*-positive virulence profiles. *J Clin Microbiol*. 2002; 40: 4585-4593.
  53. Elder RO, Keen JE, Siragusa GR, Barkocy-Gallagher GA, Koohmaraie M, Laegreid WW. Correlation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 prevalence in feces, hides, and carcasses of beef cattle during processing. *Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU*. 2000; 97: 2999-3003.
  54. Erdem AL, Avelino F, Xicohtencatl-Cortes J, Girón JA. Host protein binding and adhesive properties of H6 and H7 flagella of attaching and effacing *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 2007; 189: 7426-7435.
  55. Erickson MC, Doyle MP. Food as a vehicle for transmission of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *J Food Prot*. 2007; 10: 2426-2449.
  56. Etcheverría AI, Padola NI, Sanz ME, Polifroni R, Krüger A, Passucci J, Rodríguez EM, Taraborelli AI, Ballerio M, Parma AE. Occurrence of Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) on carcasses and retail beef cuts in the marketing chain of beef in Argentina. *Meat Sc*. 2010; 86: 418-421.
  57. Ewing WH, Edwards PR. Edwards and Ewing's Identification of *Enterobacteriaceae*. En: Ewing WH (Ed). New York: Elsevier; 1986.
  58. Feng P, Lampel KA, Karch H, Whittam TS. Genotypic and phenotypic change in the emergence of *Escherichia coli* O157:H7. *J Infect Dis*. 1998; 177: 1750-1753.
  59. Ferens WA, Hoyde CJ. *Escherichia coli* O157:H7 animal reservoir and sources of human infection. *Foodborne Pathog Dis*. 2011; 8: 465-487.
  60. Fitzhenry R, Dahan S, Torres AG, Chong Y, Heuschkel R, Murch S, Thomson M, Kaper JB, Frankel G, Phillips AD. Long polar fimbriae and tissue tropism in *Escherichia coli* O157:H7. *Int J Med Microbiol*. 2006; 296: 547-552.
  61. Forsythe SJ. *Alimentos seguros: Microbiología*. 1ra edición. Zaragoza, España, Editorial Acribia SA. 2000.
  62. Frankel G, Phillips AD, Trabulsi LR, Knutton S, Dougan G, Matthews SE. Intimin and the host cell—is it bound to end in Tir(s)? *Trends Microbiol*. 2001; 9: 214- 218.
  63. Friedrich AW, Bielaszewska M, Zhang W, Pulz M, Kuczius T, Ammon A, Karch H. *Escherichia coli* harboring Shiga toxin 2 gene variants: Frequency and association with clinical symptoms. *J Infect Dis*. 2002; 185: 74-84.
  64. Friedrich AW, Zhang W, Bielaszewska M, Mellmann A, Köck R, Fruth A, Tschäpe H, Karch H. Prevalence, virulence profile, and clinical significans of Shiga toxin-negative variants of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 infection in humans. *Clin. Infect. Dis*. 2007; 45: 39-45.

65. Galland JC, Hyatt DR, Crupper SS, Acheson DW. Prevalence, antibiotic susceptibility, and diversity of *Escherichia coli* O157:H7 isolates from a longitudinal study of beef cattle feedlots. *Appl Environ Microbiol.* 2001; 67 (4): 1619-1627.
66. Gannon VPJ, Teerling C, Masrei SA, Gyles CL. Molecular cloning and nucleotide sequence of another variant of the *Escherichia coli* Shiga-like toxin II family. *J Gen Microbiol.* 1990; 136: 1125-1135.
67. 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.
68. Gordon J, Small PLC. Acid resistance in enteric bacteria. *Infect Immun.* 1993; 61 (1): 364-367.
69. Griffin PM, Bell BP, Cieslak PR, Tuttle J, Barret TJ, Doyle MP, y col. Large outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 in the Western United States: the big picture. En: *Recent advances in verocytotoxin-producing Escherichia coli infections.* Karmali MA, Goglio AG (Eds). Elsevier Amsterdam, Lausanne, New York, Oxford Shannon, Tokyo, 1994, p. 7-12.
70. Griffin PM, Tauxe RV. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiol. Rev.* 1991; 13: 60-98.
71. Guth BEC, Prado V, Rivas M. Capítulo 5: Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. En: *Pathogenic Escherichia coli in Latin America.* Torres AGT (eds). Bentam Science Publishers, 2011, p. 65-83.
72. Gyles CL. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: An overview. *J Anim Sci.* 2007; 85: E45-E62.
73. Hancock DD, Besser TE, Rice DH, Ebel ED, Herriot DE, Carpenter LV. Multiple source of *Escherichia coli* O157 in feedlots and dairy farms in the Northwestern EEUU. *Preven Vet Med.* 1998; 35: 11-19.
74. Hengge-Aronis R. The general stress response in *Escherichia coli*. En: *Bact Stress Resp.* Storz y Hengge Editores. Washington: ASM Press, 2000.
75. Heuvelink AE, Roessink GL, Bosboom K, de Boer E. Zero-tolerance for fecal contamination of carcasses as a tool in the control of O157 VTEC infection. *Int J Food Microbiol.* 2001; 66:13-20.
76. House B, Kus JV, Prayitno N, Mair R, Que L, Chingcuanco F, Gannon V, Cvitkovitch DG, Foster DB. Acid-stress-induced changes in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 virulence. *Microbiol.* 2009; 155: 2907-2918.
77. 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.
78. Iida KI, Mizunoe Y, Wai SN, Yoshida SI. Type 1 fimbriation and its phase switching in diarrheagenic *Escherichia coli* strains. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2001; 8: 489-495.
79. Instituto de promoción de la carne vacuna argentina (IPCVA). Informe del Área de Información Económica y Estadística IPCVA. 2008. En <http://www.ipcva.com.ar/>.
80. Ito H, Terai A, Kurazono H, Yakeda Y, Nishibuchi M. Cloning and nucleotide sequencing of Vero toxin 2 variant genes from the *Escherichia coli* O91:H21 isolated from a patient with the hemolytic uremic syndrome. *Microb Pathog.* 1990; 8:47-60.
81. Jelacic JK, Damrow T, Chen GS, Jelacic S, Bielaszewska M, Ciol M, Carvalho HM, Melton-Celsa AR, O'Brien AD, Tarr PI. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Montana: Bacterial genotypes and clinical profiles. *J Infect Dis.* 2003; 188: 719-129.

82. Jenkins C, Willshaw GA, Evans J, Cheasty T, Chart H, Shaw DJ, et al. Subtyping of virulence genes in verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) other than serogroup O157 associated with disease in the United Kingdom. *J Med Microbiol.* 2003; 52: 941-47.
83. 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 Argent Microbiol.* 2010; 42: 284-287.
84. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol.* 2004; 2:123-140.
85. Karch H, Meyer T. Single primer pair for amplifying segments of distinct Shiga-like-toxin genes by polymerase chain reaction. *J Clin Microb.* 1989; 27: 2751-57.
86. Karch H, Böhm H, Schmidt H, Ganzer F, Aleksic S, Heesemann J. Clonal structure and pathogenicity of Shiga-like toxin-producing, sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157:H-. *J Clin Microbiol.* 1993; 31:1200-1205.
87. Karch H, Bielaszewska M. Sorbitol-fermenting Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H(-) strains: epidemiology, phenotypic and molecular characteristics, and microbiological diagnosis. *J Clin Microbiol.* 2001; 39: 2043-2049.
88. Karmali MA, Steele BT, Petric M, Lim C. Sporadic cases of haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in tools. *Lancet.* 1983; 1: 619-620.
89. Karmali MA, Petric M, Lim C, Cheung R, Arbus GS. Sensitive method for detecting low numbers of verotoxin-producing *Escherichia coli* in mixed cultures by use of colony sweeps and polymyxin extraction of verotoxin. *J Clin Microbiol.* 1985; 22: 614-619.
90. Karmali MA, Mascareñas M, Shen S, Ziebell K, Johnson S, Reid-Smith R, Isaac-Renton J, Clark C, Rahn K, Kaper JB. Association of genomic O island 122 *Escherichia coli* EDL933 with verotoxin-producing *Escherichia coli* seropathotypes that are linked to epidemic and/or serious disease. *J Clin Microbiol.* 2003; 41: 4930-4940.
91. Karmali MA. Infection by Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: An overview. *Mol Biotechnol.* 2004; 26: 117-122.
92. Kenny B, Devinney R, Stein M, Reincheid DJ, Frey EA, Finlay BB. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) transfer its receptor for intimate adherence into mammalian cells. *Cell.* 1997; 91: 511-20.
93. Khakhria R, Duch D, Lior H. Extended phage-typing scheme for *Escherichia coli* O157:H7. *Epidemiol Infect.* 1990; 105: 511-520.
94. Kokai-Kun JF, Melton-Celsa AR, O'Brien AD. Elastase in intestinal mucus enhances the cytotoxicity of Shiga toxin type 2d. *J Biol Chem.* 2000; 275: 3713-3721.
95. Koohmaraie M, Arthur TM, Bosilevac JM, Guerini M, Shackelford SD, Wheeler TL. Post-harvest interventions to reduce/eliminate pathogens in beef. *Meat Sc.* 2005; 71: 79-91.
96. Koohmaraie M, Arthur TM, Bosilevac JM, Brichta-Harhay DM, Kalchayanand N, Shackelford SD, Wheeler TL. Interventions to reduce/eliminate *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef. *Meat Cs.* 2007; 77(1): 90-96.
97. Knowalchuk J, Speir JI, Stavric S. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 1977; 18: 775-779.
98. Large TM, Seth TW, Whittam TS. Variation in acid resistance among Shiga toxin-producing clones of pathogenic *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005; 71 (5): 2493-2500.

99. Lasta JA, Rodríguez HR, Zanelli M, Margaria CA. Bacterial count from bovine carcasses as an indicator of hygiene in slaughtering places: A proposal for sampling. *J Food Prot.* 1992; 54 (4): 271-278.
100. Law D. Virulence factors of *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin producing *E. coli*. *J Appl Microbiol.* 2000; 88: 729-45.
101. Lee JA, Choi SJ. Isolation and characteristics of sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157 strains from cattle. *Microb Infect.* 2006; 8: 2021-2026.
102. Leotta GA, Chinen I, Epszteyn S, Miliwebsky E, Melamed IC, Motter M. Validation of a multiplex PCR for detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Rev Arg Microbiol.* 2005; 37: 1-10.
103. Leotta GA, Miliwebsky E, Chinen I, Espinoza EM, Azzopardi K, Tennant S, Robins-Browne RM, Rivas M. Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 strains isolated from humans in Argentina, Australia and New Zealand. *BMC Microbiol.* 2008; 8: 46-54.
104. Leyer GJ, Wang LL, Johnson EA. Acid adaptation of *Escherichia coli* O157:H7 increases survival in acidic foods. *Appl Environ Microbiol.* 1995; 61: 3752-3755.
105. Leung PHM, Peiris JSM, Ng WWS, Robins-Browne RM, Bettelheim KA, Yam WC. A newly discovered verotoxin variant, VT2g, produced by bovine verocytotoxigenic *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.* 2003; 69: 7549-7553.
106. Lin J, Smith MP, Chapin KC, Baik HS, Bennett GN, Foster JW. Mechanisms of acid resistance in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.* 1996; 62: 3094-3100.
107. Loewen PC, Hu B, Strutinsky J, Sparling R. Regulation in the rpoS regulon of *Escherichia coli* O157:H7. *Can J Microbiol.* 1998; 44: 707-717.
108. Mainil JG, Daube G. Verotoxigenic *Escherichia coli* from animals, humans and food who is who? *J Appl Microbiol.* 2003; 98: 1332-1344.
109. Manual de Procedimientos “Detección de STEC O157 en alimentos”. Servicio Fisiopatogenia. Dpto. de Bacteriología. INEI – ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”, Buenos Aires, Argentina, 2008.
110. McClure P. Capítulo 10: *Escherichia coli*: virulence, stress response and resistance. En: Understanding pathogen behavior. Virulence, stress response and resistance. 1st edition. Abington, England, CRC Press LLC, 2005.
111. Meichtri L, Miliwebsky E, Gioffré A, Chinen I, Baschkier A, Chillemi G. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in healthy young beef steer from Argentina: prevalence and virulence properties. *J Food Microbiol.* 2004; 96: 189-98.
112. Mellmann A, Bielaszewska M, Zimmerhackl LB, Prager R, Harmsen D, Tschäpe H, Karch H. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* in human infections: in vivo evolution of bacterial pathogen. *Clin Infect Dis.* 2005; 45: 39-45.
113. Melton-Celsa AR, Darnell SC, O’Brien AD. Activation of Shiga-like toxins by mouse and human intestinal mucus correlates with virulence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O91:H21 isolates in orally infected, streptomycin-treated mice. *Infect Immun.* 1996; 64: 1569-1576.
114. Mercado EC, Gioffre A, Rodríguez SM, Cataldi A, Irino K, Elizondo AM, Cipolla AL, Romano MI, Malena R, Méndez MA. Non-O157 Shiga-toxin producing *Escherichia coli* isolated from diarrhoeic calves in Argentina. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* 2004; 51 (2): 82-88.
115. Miller LG, Kaspar CW. *Escherichia coli* O157:H7 acid tolerance and survival in apple cider. *J Food Prot.* 1994; 57: 460-464.

116. Morgan D, Newman CP, Hutchinson DN, Walker AM, Rowe B, Majid F. Verotoxin producing *Escherichia coli* O157 infections associated with consumption of yogurt. *Epidemiol Infect.* 1993; 111: 181-187.
117. Naylor SW, Gally DL, Low JC. Enterohaemorrhagic *E. coli* in veterinary medicine. *Int J Med Microbiol.* 2005; 295: 419-441.
118. Nicholls L, Grant TH, Robins-Browne RM. Identification of a novel genetic locus that is required for in vitro adhesion of a clinical isolate of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* to epithelial cells. *Mol Microbiol.* 2000; 35: 275-88.
119. Nielsen EM, Tegmeier C, Andersen HJ, Gronbaek C, Andesen JS. Influence of age, sex, and herd characteristics on the occurrence of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in Danish dairy farms. *Vet Microbiol.* 2002; 88: 245-257.
120. O'Brien AD, La Veck GD, Thompson MR, Formal SB. Production of *Shigella dysenteriae* type-1- like cytotoxin by *Escherichia coli*. *J Infect Dis.* 1982; 146: 763-769.
121. O'Brien AD, Newland JW, Miller SF, Holmes RK, Smith HW, Formal SB. Shiga-like toxin-converting phages from *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis or infantile diarrhea. *Science.* 1984; 226: 694-696.
122. O'Brien AD, Holmes RK. Shiga and Shiga-like toxins. *Microbiol Rev.* 1987; 51: 206-220.
123. O'Brien SB, Duffy G, Carney G, Sheridan JJ, McDowell DA, Blair IS. Prevalence and numbers of *Escherichia coli* O157 on bovine hide at a beef slaughter plant. *J Food Prot.* 2005; 68: 660-665.
124. Omisakin F, MacRae M, Ogden ID, Strachan NJC. Concentration and prevalence of *Escherichia coli* O157 in cattle feces at slaughter. *Appl Environ Microbiol.* 2003; 69 (5): 2444-2447.
125. Ørskov F, Ørskov I. Serotyping of *Escherichia coli*. En: *Methods in Microbiology.* Bergan T (ed). London: Academic Press; 1984. p. 43-112.
126. Ørskov F, Ørskov I, Villar JA. Cattle as reservoir of verotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. *Lancet* 1987; 2: 276.
127. Ørskov F, Ørskov I. *Escherichia coli* serotyping and disease in man and animals. *Can J Microbiol.* 1992; 38 (7): 699-704.
128. 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).*
129. Padola NL, Sanz ME, Blanco JE, Blanco M, Blanco J, Etcheverría AI. Serotypes and virulence genes of shigatoxigenic *Escherichia coli* (STEC) isolated from feedlot in Argentina. *Vet Microbiol.* 2004; 100: 3-9.
130. Parma A, Sanz E, Blanco ME, Blanco JE, Viñas J, Blanco MR, Padola NL, Etcheverría AI. Virulence genotypes and serotypes of verotoxigenic *Escherichia coli* isolated from cattle. *Eur J Epidemiol.* 2000; 16: 757-762.
131. Paton JC, Paton AW. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clin Microbiol Rev.* 1998a; 11: 450-479.
132. Paton AW, Woodrow MC, Doyle RM, Lanser JA, Paton JC. Molecular characterization of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* O113:H21 strain lacking *eae* responsible for a cluster of cases of hemolytic-uremic syndrome. *J Clin Microbiol.* 1999; 37: 3357-61.
133. Paton AW, Srimanote P, Woodrow MC, Paton JC. Characterization of Saa, a novel autoagglutinating adhesin produced by locus of enterocyte effacement-negative

- Shigatoxigenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans. *Infect Immun.* 2001; 69: 6999-7009.
134. Peng S, Tasara T, Hummerjohann J., Stephan R. An overview of Molecular Stress Response Mechanisms in *Escherichia coli* contributing to Survival of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* during Raw Milk Cheese production. *J Food Prot.* 2011; 74 (5): 849-864.
  135. Persson S, Olsen KE, Ethelberg S, Scheutz F, Subtyping methods for *Escherichia coli* Shiga toxin (verocytotoxin) 2 variants and correlation to clinical manifestations. *J Clin Microbiol.* 2007; 45: 2020-2024.
  136. Phillips D, Sumner J, Alexander JF, Dutton KM, Microbiological quality of Australian beef. *J Food Prot.* 2001; 64 (5): 692-696.
  137. Pièrard D, Muyltermans G, Moriau L, Stevens D, Lauwers S. Identification of new verocytotoxin type 2 variant B-subunit genes in human and animal *Escherichia coli* isolates. *J Clin Microbiol.* 1998; 36: 3317-3322.
  138. Price SB, Wright JC, DeGrave FJ, Castanie-Cornet MP, Foster JW. Acid resistance systems required for survival of *Escherichia coli* O157:H7 in the bovine gastrointestinal tract and in apple cider are different. *Appl Environ Microbiol.* 2004; 70 (8): 4792-4799.
  139. Ratnam S, March SB, Ahmed R, Bezanson G, Kasatiya S. Characterization of *Escherichia coli* Serotype O157:H7. *J Clin Microbiol.* 1988; 26 (1): 2006-2012.
  140. Rhoades JR, Duffy G, Koutsoumanis K. Prevalence and concentration of verocytotoxigenic *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* in the beef production chain: a review. *Food Microbiol.* 2009; 26: 357-376.
  141. Ribot EM, Fair MA, Gautom R, Cameron DN, Hunter SB, Swaminathan B, Barrett TJ. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. *Foodborne Pathog Dis.* 2006; 3: 59-67.
  142. Richard HT, Foster JW. Acid resistance in *Escherichia coli*. *Adv Appl Microbiol.* 2003; 52: 167-186.
  143. Riley LW, Remis RS, Helgerson SD, McGee HB, Weels JG, Davies BR, Herbert RJ, Olcott ES, Johnson LM, Hargrett NT, Blake PA, Cohen ML. Haemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N Engl J Med.* 1983; 308: 681-685.
  144. Riordan DC, Duffy G, Sheridan JJ, Whiting RC, Blair IS, McDowell DA. Effect of acid adaptation, product pH, and heating on survival of *Escherichia coli* O157:H7 in pepperoni. *Appl Environ Microbiol.* 2000; 66: 1726-1729.
  145. Rivas M, Calletti MG, Chinen I, Refi SM, Roldán CD, Chillemi G, Fiorilli G, Bertolotti A, Aguerre L, Sosa-Estani S. Home-prepared hamburger as the source for a sporadic case of hemolytic uremic syndrome, Argentina. *Emerg Infect Dis.* 2003; 9: 1184-1186.
  146. Rivas M, Miliwebsky E, Chinen I, Roldán CD, Balbi L, García B, Fiorilli G, Sosa-Stani S, Kincaid J, Rangel J, Griffin PM. Characterization and epidemiologic subtyping of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* strains isolated from hemolytic uremic syndrome and diarrhea cases in Argentina. *Foodborne Pathog Dis.* 2006; 3(1): 88-96.
  147. Rivas M, Sosa-Estani S, Rangel J, Calletti MG, Vallés P, Roldán CD, Balbi L, Marsano de Mollar MC, Amoedo D, Miliwebsky E, Chinen I, Hoekstra RM, Mead P, Griffin PM. Risk factor sporadic Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in children, Argentina. *Emerg Infect Dis.* 2008; 14: 763-771.
  148. Rivas M, Chinen I, Miliwebsky E, Galli L, Repetto HA, Masana M. Capítulo 8: Epidemiology of Argentinean STEC. En: *Population Bacterial Genetics: A Tribute to*

- Thomas S. Whittam. ASM Press, Washington, DC, Ed. Walk S y Feng P, 2011, p. 109-132.
149. Rivera-Betancourt M, Shackelford SD, Arthur TM, Westmoreland KE, Bellinger G, Rossman M, Reagan JO, Koochmaraie M. Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella* in two geographically distant commercial beef processing plants in the United State. *J Food Prot.* 2004; 67(2): 295-302.
  150. Roering AM, Luchansky JB, Ihnot AM, Ansay SE, Kaspar CW, Ingham SC. Comparative survival of *Salmonella* typhimurium DT 104, *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli* O157:H7 in preservative-free apple cider and simulated gastric fluid. *Int J Food Microbiol.* 1999; 46: 263-269.
  151. Rolgaard BB, Scheutz F, Boel J, Aabo S, Schultz AC, Cheasty T, Møller Nielsen E, Olsen KEP, Christensen BB. VTEC O157 subtypes associated with the most severe clinical symptoms in humans constitute a minor part of VTEC O157 from Danish cattle. *Int J Med Microbiol.* 2004; 294: 255-259.
  152. Ryu JH, Deng Y, Beuchat LR. Behavior of acid-adapted and unadapted *Escherichia coli* O157:H7 when exposed to reduce pH achieved with various organic acid. *J Food Prot.* 1998; 62 (5): 451-455.
  153. Samelis J, Ikeda JS, Sofos JN. Evaluation of the pH-dependent, stationary-phase acid tolerance in *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Typhimurium DT104 induced by culturing in media whit 1% glucose: a comparative study with *Escherichia coli* O157:H7. *J Appl Microbiol.* 2003; 95: 563-575.
  154. Sanz ME, Viñas MR, Parma AE. Prevalence of bovine verotoxin-producing *Escherichia coli* in Argentina. *Eur J Epidemiol.* 1998; 14: 399-403.
  155. Saridakis CE, Johnson RP, Benson A, Ziebell K, Gyles CL. Influence of animal origin and lineage on survival of *Escherichia coli* O157:H7 strains in strong and weak acid challenges. *J Food Prot.* 2004; 67 (8): 1591-1596.
  156. Scheutz F, Beutin L, Piérard D, Smith HR. Appendix: Nomenclature of verocytotoxins. In: Duffy G, Garvey P, McDowell D (eds). *Verocytotoxigenic E. coli*. Food and Nutrition. Connecticut, Press Inc, 2001.
  157. Scheutz F, Strockbine NA. Genus I. *Escherichia*. In: Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, editors. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2da Edición, Springer, EEUU, 2005, p. 607-624.
  158. Schmidt H, Beutin L, Karch H. Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL933. *Infect Immun.* 1995; 63: 1055-61.
  159. Schmidt H, Scheef J, Huppertz HI, Frosch M, Karch H. *Escherichia coli* O157:H7 and O157:H2 strains that do not produce Shiga toxin: Phenotypic and genetic characterization of isolates associated whit diarrhea and Hemolytic-Uremic Syndrome. *J Clin Microbiol.* 1999; 37 (11): 3491-3496.
  160. Schmidt H, Scheef J, Morabito S, Caprioli A, Wieler LH, Karch H. A new Shiga toxin 2 variant (Stx2f) from *Escherichia coli* isolated from pigeons. *Appl Environ Microbiol.* 2000; 66: 1205-1208.
  161. Schmitt CK, McKee ML, O'Brien AD. Two copies of Shiga-like toxin II-related genes common in enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains are responsible for the antigenic heterogeneity of the O157:H- strain E32511. *Infect Immun.* 1991; 59: 1065 1073.
  162. Scott L, McGee P, Minihan D, Sheridan JJ, Earley B, Leonard N. The characterization of *E. coli* O157:H7 isolates from cattle feces and feedlot environment using PFGE. *Vet Microbiol.* 2006; 114: 331-336.

163. Smith WE, Kane AV, Campbell ST, Acheson DW, Cochran BH, Thorpe CM. Shiga toxin 1 triggers a ribotoxic stress response leading to p38 and JNK activation and induction of apoptosis in intestinal epithelial cells. *Infect Immun*. 2003; 71: 1497-1504.
164. Spizzirri FD, Rahman RC, Bibiloni N, Ruscasso JD, Amoreo OR. Childhood hemolytic uremic syndrome in Argentina: long-term follow-up and prognostic features. *Pediatr Nephrol*. 1997; 11: 156-160.
165. Steele BT, Murphy N, Rance CP. An outbreak of hemolytic uremic syndrome associated with ingestion of fresh apple juice. *J Pediatr*. 1982; 101: 963-965.
166. Stephan R, Zhang W, Bielaszewska M, Mellmann A, Karch H. Phenotypic and genotypic traits of Shiga toxin-negative *E. coli* O157:H7/H<sup>-</sup> bovine and porcine strains. *Foodborne Pathog Dis*. 2009; 6 (2): 235-244.
167. Strockbine NA, Marques LR, Newland JW, Smith HW, Holmes RK, O'Brien AD. Two toxin-converting phages from *Escherichia coli* O157:H7 strain 933 encodes antigenically distinct toxins with similar biologic activities. *Infect Immun*. 1986; 53:135-140.
168. Strockbine NA, Wells JG, Bopp CA, Barrett TJ. En: *Escherichia coli* O157:H7 and Other Shiga toxin Producing *E. coli* strains. Kaper JB, O'Brien AD (editores), Washington DC, ASM Press, 1998, p. 331-356.
169. Swaminathan B, Gerner-Smidt P, Ng LK, Lukinmaa S, Kam KM, Rolando S, Gutierrez EP, Binsztein N. Building PulseNet International: An interconnected system of laboratory networks to facilitate timely public health recognition and response to foodborne disease outbreak and emerging foodborne diseases. *Foodborne Pathog Dis*. 2006; 3: 36-50.
170. Tanaro JD, Leotta GA, Lound LH, Galli L, Piaggio MC, Carbonari CC, Araujo S, Rivas M. *Escherichia coli* in bovine feces and surface water streams in a beef cattle farm of Argentina. *Foodborne Pathog Dis*. 2010; 7: 475-477.
171. Tarr PI, Bilge SS, Vary JC, Jelacic S, Habeeb RL, Ward TR. Iha: a novel *Escherichia coli* O157:H7 adherence-conferring molecule encoded on a recently acquired chromosomal island of conserved structure. *Infect Immun*. 2000; 68: 1400-07.
172. Tatsuno I, Horie M, Abe H, Miki T, Makino K, Shinagawa H, et al. toxB gene on pO157 of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 is required for full epithelial cell adherence phenotype. *Infect Immun*. 2001; 69: 6660-6669.
173. Torres AG, Milflores-Flores L, Garcia-Gallegos JG, Patel SD, Best A, La Ragione RM, Martinez-Laguna Y, Woodward MJ. Environmental regulation and colonization attributes of the long polar fimbriae of *Escherichia coli* O157:H7. *Int J Med Microbiol*. 2007a; 297: 177-185.
174. Tyler SD, Johnson WM, Lior H, Wang G, Rozee KR. Identification of Verotoxin type 2 variant B subunit genes in *Escherichia coli* by the polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. *J Clin Microbiol*. 1991; 29: 1339-1343.
175. U. S. Department of Agriculture, Food Safety Inspection Service. Detection, isolation, and identification of *Escherichia coli* (*E. coli*) O157:H7 and O157:NM (nonmotile) from meat products. En: Microbiology laboratory guidebook. U. S. Department of Agriculture, Food Safety Inspection Service, Washington, DC, 2002.
176. U. S. Department of Agriculture, Food Safety Inspection Service. Detection, isolation, and identification of *Escherichia coli* O157:H7 in beef slaughter establishments. 2005. Disponible en: [http://www.fsis.usda.gov/PDF/IIT\\_Methodology\\_for\\_Ecoli.pdf](http://www.fsis.usda.gov/PDF/IIT_Methodology_for_Ecoli.pdf).
177. U. S. Department of Agriculture, Food Safety Inspection Service. Timeline of events related to *Escherichia coli* O157:H7. 2013. Disponible en:

<http://www.fsis.usda.gov/wps/portal/fsis/topics/regulatory-compliance/haccp/updates-and-memos/timeline-of-events-related-to-e-coli-o157h7/e-coli-timeline>.

178. Van Donkersgoed J, Graham T, Gannon V. The prevalence of verotoxins, *Escherichia coli* O157:H7, and *Salmonella* in the feces and rumen of cattle at processing. *Can Vet J*. 1999; 40: 332-338.
179. Van Hoek AHAM, Aarts HJM, Bouw E, van Overbeek WM, Franz E. The role of *rpoS* in *Escherichia coli* o157 manure-amended soil survival and distribution of allelic variations among bovine, food and clinical isolates. *FEMS Microbiol Lett*. 2013; 338: 18-23.
180. Vanaja SK, Springman AC, Besser TE, Whittam TS, Manning SD. Differential expression of virulence and stress fitness genes between *Escherichia coli* O157:H7 strains with clinical or bovine-biased genotypes. *App Environ Microbiol*. 2010; 76 (1): 60-68.
181. Vidal JE, Canizález-Román A, Gutiérrez-Jiménez J, Navarro-García F. Patogénesis molecular, epidemiología y diagnóstico de *Escherichia coli* enteropatógena. *Salud Pública de Mex*. 2007; 49 (5): 376-386.
182. Waterman SR, Small PLC. Characterization of the acid resistance phenotype and *rpoS* alleles of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli*. *Infect Immun*. 1996; 64 (7): 2808-2811.
183. Weinstein DL, Jackson MP, Samuel JE, Holmes RK, O'Brien AD. Cloning and sequencing of a Shiga-like toxin type II variant from *Escherichia coli* strain responsible for edema disease of swine. *J Bacteriol*. 1988; 170: 4223-4230.
184. Whiting RC, Golden MH. Variation among *Escherichia coli* O157:H7 strains relative to their growth, survival, thermal inactivation, and toxin production in broth. *Int J Food Microbiol*. 2002; 75: 127-133.
185. Wick LM, Qi W, Lacher DW, Whittam TS. Evolution of genomic content in the stepwise emergence of *Escherichia coli* O157:H7. *J Bacteriol*. 2005; 187 (85): 1783-1791.
186. Wong CS, Jelacic S, Habeeb RL, Watkins SL, Tarr PI. The risk of the hemolytic-uremic syndrome after antibiotic treatment of *Escherichia coli* O157:H7 infections. *N Engl Med*. 2000; 342: 1930-1936.
187. Yousef AE, Courtney PD. Basics of stress adaptation and implications in new-generation foods. En: *Microbial Stress Adaptation and Food Safety*. 1ra edición. EEUU, Ed. Yousef and Juneja, CRC Press LLC, 2003.
188. Zhang W, Bielaszewska M, Thorsten K, Karch H. Identification, characterization, and distribution of a Shiga toxin 1 gene variant (*stx1c*) in *Escherichia coli* strains isolated from humans. *J Clin Microbiol*. 2002; 40: 1441-1446.
189. Zhao T, Doyle MP. Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in commercial mayonnaise. *J Food Prot*. 1994; 57: 780-783.
190. Zotta CM, Carbonari C, Gómez D, Deza N, Lavayen S, Milibwebsky E, Monzani V, Manfredi E, Morvay L, Rivas M. Nuevo patrón genético de *Escherichia coli* O157:H7 biotipo "B" en Argentina. *Acta Bioquim Clin Latinoam*. 2009; 43 (4): 589-591.