

Universidad de la República

PEDECIBA-BIOLOGÍA

Doctorado en Ciencias Biológicas, Orientación Microbiología

Identificación y caracterización de *Escherichia coli* asociada a la Diarrea Neonatal de Terneros en Uruguay

Mag. Ana Umpiérrez

Tutor:

Dr. Pablo Zunino

Tribunal:

Dra. Magela Laviña

Dr. Juan Arbiza

Dr. Alejandro Chabalgoity

Departamento de Microbiología

Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable



ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	5
ABREVIATURAS	7
RESUMEN	8
ANTECEDENTES	9
Diarrea neonatal en terneros.....	9
Clasificación de la DNT	10
Agentes etiológicos de la DNT	11
<i>E. coli</i> y la DNT.....	11
Detección y diagnóstico de DNT	15
Prevención y tratamiento	16
Manejo y nutrición.....	16
Vacunación.....	17
Antibioticoterapia y metafilaxis.....	18
HIPÓTESIS	21
OBJETIVO GENERAL	21
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
Capítulo 1.....	22
Capítulo 2.....	22
Capítulo 3.....	22
MATERIALES Y MÉTODOS	23
1. Aislamientos bacterianos	23
1.1 Elaboración de formulario.....	23
1.2 Recepción de muestras y siembra de heces.....	23
1.3 Cultivo rutinario de los aislamientos de <i>E. coli</i> y almacenamiento.....	24
1.4 Identidad de los aislamientos.....	24
2. Identificación de genes asociados a virulencia	25
3. Diversidad intra-específica	27

3.1 <i>rep</i> -PCR y patrones de DNA- <i>fingerprinting</i>	27
3.2 <i>Multilocus Sequence Typing</i> (MLST)	28
4. Resistencia a antibióticos	29
4.1 Tamizaje primario	29
4.2 Antibiogramas	30
4.3 Elementos genéticos móviles.....	30
4.4 Mecanismos de resistencia a quinolonas y β -lactamasas transferibles	31
5. Interacción bacteriana con células eucariotas en cultivo	33
5.1 Adhesión a células Hep-2.....	33
5.2 Citotoxicidad en células VERO.....	34
6. Producción de <i>biofilms</i>.....	34
6.1 Técnica semi-cuantitativa de tinción con Cristal Violeta	34
6.2 Análisis de la bioarquitectura de los <i>biofilms</i> por Microscopía Laser Confocal (MLC)	35
7. Expresión de CS31A.....	37
7.1 Producción de ClpG recombinante.....	37
7.2 Sobreexpresión de ClpG recombinante en <i>E. coli</i>	40
7.3 Purificación de ClpG recombinante	41
7.4 Visualización de ClpG recombinante (SDS-PAGE).....	42
7.5 Cuantificación de ClpG recombinante	43
7.6 Producción de anticuerpos policlonales anti-ClpG en ratón.....	43
7.7 Confirmación de la identidad de la proteína recombinante	44
7.8 Evaluación de la expresión de CS31A en los aislamientos de <i>E. coli</i>	45
8. Análisis Estadísticos	46
CAPÍTULO 1.....	47
Introducción.....	48
Resultados.....	50
Generación de la colección de aislamientos de <i>E. coli</i>	50
Análisis de genes asociados a virulencia de <i>E. coli</i>	53
Discusión.....	58
CAPÍTULO 2.....	62
Introducción.....	63
Resultados.....	66
Diversidad intra-específica de la colección.....	66
Estructura poblacional de la colección de <i>E. coli</i> mediante MLST	71
Resistencia a antimicrobianos de la colección.....	75
Discusión.....	78
CAPÍTULO 3.....	84

Introducción.....	85
Resultados.....	87
Adhesión a células Hep-2.....	87
Producción de <i>biofilms</i>	88
Expresión <i>in vitro</i> de ClpG.....	93
Efecto citotóxico en cultivos de células VERO	98
Discusión.....	99
CONCLUSIONES.....	102
PERSPECTIVAS.....	106
REFERENCIAS	108
ANEXO I.....	127
Planilla recolección de muestras.....	127
ANEXO II.....	128
Filogenia de la colección	128
ANEXO III	129
Diversidad de la colección de aislamientos de <i>E. coli</i> (ERIC-PCR).....	129
ANEXO IV	130
Publicaciones.....	130

AGRADECIMIENTOS

A Pablo Zunino, por darme la oportunidad de realizar este trabajo, por haberme dirigido durante estos años y en particular por haberme permitido desarrollarme en la microbiología como tanto yo quería.

A Sofía Acquistapace, Martín Oliver y Sofía Fernández, excelentes personas con quienes compartí momentos inigualables en el transcurso de estos años de trabajo en equipo.

A la ANII, por la financiación de mi beca de doctorado y el proyecto Fondo Clemente Estable para jóvenes investigadores.

A Laboratorios Santa Elena-VIRBAC SA, por financiar parte de los ensayos y principalmente por colaborar en la colecta de muestras. En especial a Eduardo Reolón y Patricia Acuña con quienes trabajamos en contacto directo en el transcurso del doctorado.

A PEDECIBA, por financiarme una pasantía en la Facultad de Veterinaria de la Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires (UNCPBA), Argentina.

A Nora Lía Padola, Guillermo Arroyo y las chicas del laboratorio de Inmunoquímica y Biotecnología de la Facultad de Veterinaria de la UNCPBA en Tandil, por haberme recibido muy bien durante mi estadía en su laboratorio.

A Rosario de los Santos, Sofía Vanzini, Alfredo Scarpa y Martina Soumastre por colaborar en la colecta de muestras.

A Rafael Vignoli del Departamento de Bacteriología y Virología de la Fac. de Medicina, por su colaboración en los ensayos de susceptibilidad a antibióticos y mecanismos de resistencias transferibles.

A Inés Bado, amiga desde el inicio de la carrera y ahora también compañera de trabajo, por su colaboración en los ensayos de antibióticos, por enseñarme mucho y siempre estar disponible para mis consultas.

A Vanesa Sosa, que sin querer queriendo fue la que me introdujo en el estudio de microorganismos patógenos que afectan a bovinos.

A Karina Antúnez, por siempre ayudar a mejorar mi trabajo y responder mis dudas.

A Paola, Victoria, Majo y Anita C. que colaboraron conmigo en los ensayos de *biofilms* y análisis de imágenes del confocal

A Belén y Gabi, que siempre me dieron una mano cuando lo necesité interpretando resultados.

A Martín Fraga, que siempre me hace reír con alguna canción.

A todos los integrantes de la Colonia, con quienes he compartido gratos momentos y extensas jornadas de laboratorio, con quienes aprendí un montón de microbiología y de la vida: Belén, Gabriela, Sofi F, Sofi A, Martín, Martina, Susana, Paula, Karina, Claudia, Daniela, Paola, Loreley, Victoria, Ana Laura, Majo, Magalí.

A toda mi familia, que siempre está presente.

A mis amigas, que hacen que no olvide las cosas importantes en la vida.

Dedicado a mis padres, que me enseñaron que para alcanzar las metas hay que trabajar duro y no rendirse, y a Nacho, por acompañarme en todo momento, por darme fuerzas cuando pensaba que no podía y regalarme una sonrisa todos los días.

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
APEC	<i>Escherichia coli</i> patógena de aves
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
BSA	Seroalbúmina bovina
BLEE	β -lactamasas de espectro extendido
DAEC	<i>Escherichia coli</i> de adherencia difusa
DEC	<i>Escherichia coli</i> diarreogénicas
dNTP	Desoxinucleótido trifosfato
EAEC	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatógena
ERIC-PCR	<i>Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus</i> PCR
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica
ExPEC	<i>Escherichia coli</i> extraintestinales
LB	Luria Bertani
MALDI-TOF	Espectrometría de masas
MLST	<i>Multilocus sequence typing</i>
NTEC	<i>Escherichia coli</i> necrotoxigénica
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PMQR	<i>Plasmid-mediated quinolone-resistance</i>
rep-PCR	<i>repetitive element sequence</i> PCR
SDS-PAGE	Gel desnaturizante de acrilamida
SFB	Suero fetal bovino
ST	Secuenciotipo
STEC	<i>Escherichia coli</i> productora de Toxina Shiga
TSA	Agar Triptosa Soya
TSB	Caldo Triptona Soya
UPGMA	<i>Unweighted pair group method with arithmetic mean</i>
UPEC	<i>Escherichia coli</i> uropatógena

RESUMEN

La diarrea neonatal en terneros (DNT) es una grave enfermedad infectocontagiosa que afecta a los terneros de producción. En particular, esta patología es reconocida como uno de los mayores retos de las industrias ganaderas y muy especialmente de la industria lechera mundialmente. Presenta una alta incidencia y es responsable de importantes pérdidas económicas debidas a las altísimas tasas de morbilidad y mortalidad y gastos en tratamientos. *Escherichia coli* es uno de los agentes infecciosos más comúnmente asociados a DNT en los primeros días de vida del ternero y en general los Coronavirus y Rotavirus funcionan como agentes predisponentes para infecciones secundarias por este microorganismo.

En Uruguay la producción pecuaria tradicionalmente ha sido extensiva, pero recientemente la intención por parte de los productores de mejorar la eficiencia ha llevado a que se tienda a la intensificación de los sistemas. Actualmente el área destinada a la ganadería ha disminuido principalmente por un importante incremento de las áreas destinadas a la forestación y a la agricultura del secano. Acompañando este escenario, la cría de rumiantes en nuestro país se encuentra desafiada por el incremento de la demanda de consumo, la necesidad de agregar valor a la producción y la exigencia de un marco normativo internacional orientado a la producción saludable.

Este estudio correspondió al primer trabajo dirigido a identificar *E. coli* en heces de terneros con DNT en Uruguay. Abordó la caracterización fenotípica y molecular, el estudio de las relaciones filogenéticas y las propiedades de adhesión y citotoxicidad de aislamientos de *E. coli* presentes en distintos rodeos. Se determinó la ocurrencia de genes que codifican para adhesinas de *E. coli* (CS31A, F17) en altas prevalencias en animales sanos y con DNT, mientras que otros genes de adhesinas y toxinas (F5, Stx1, LT, STa) en bajas prevalencias. Los estudios de resistencia determinaron que muchos aislamientos de *E. coli* son multirresistentes a antibióticos, presentan mecanismos de resistencia transferibles (BLEE y proteínas QnR) y el integrón clase 1. Los análisis de diversidad establecieron una gran heterogeneidad genética, la ocurrencia de variantes genéticas capaces de causar enfermedad y la presencia de secuenciotipos altamente virulentos asociados a infecciones extraintestinales (ST69) y enterohemorrágicas (ST21) en bovinos y en humanos. Los resultados de este trabajo sugieren la potencialidad de *E. coli* aisladas de bovinos como patógenos zoonóticos. La caracterización de *E. coli* en casos de DNT aportará conocimientos para el diseño de alternativas de control de la enfermedad.

ANTECEDENTES

Diarrea neonatal en terneros

La diarrea neonatal es una grave enfermedad infectocontagiosa que afecta a los terneros criados en sistemas semi-intensivos e intensivos de producción. En particular, la diarrea neonatal de terneros (DNT) es reconocida como uno de los mayores retos de las industrias ganaderas y lecheras mundialmente (Lorenz *et al.* 2011). De acuerdo a reportes realizados en países donde la producción ganadera es una actividad central de la economía, los índices de mortalidad y morbilidad pueden ser muy elevados. Por ejemplo en Estados Unidos (EEUU), reportes realizados por el Sistema Nacional de Monitoreo de Salud Animal (NAHMS, de su sigla en inglés *National Animal Health Monitoring System*) indican que los índices de mortalidad de terneros menores de 1 mes debidos a la DNT pueden alcanzar el 57 % (United States Department of Agriculture & Animal 2007). Estos valores también ha sido reportados en países como Corea e Irlanda (Lorenz *et al.* 2011; Cho y Yoon 2014). En este último, la DNT es la causa más común de muerte, de acuerdo a estudios realizados en animales *post-mortem* (Cho y Yoon 2014). Asimismo, en países de la región en los que la ganadería intensiva tiene una importancia significativa como Argentina se estima que la prevalencia de la enfermedad puede llegar a ser superior al 60 % y la mortalidad hasta un 20 % (Margueritte *et al.* 2005). Asociados a estos elevados porcentajes de morbilidad y mortalidad, las pérdidas económicas debidas a DNT son también muy significativas. Más aún, los costos en tratamientos, en mano de obra para el cuidado de los animales y las tasas de crecimiento lentas se incrementan todos los años y constituyen un problema común a nivel mundial para los productores ganaderos (United States Department of Agriculture 2008a; Cho y Yoon 2014).

En Uruguay la producción pecuaria tradicionalmente ha sido de tipo extensiva, pero recientemente la intención por parte de los productores de mejorar la eficiencia ha llevado a que se tienda a la intensificación de los sistemas. A pesar de que los sistemas intensivos pueden mejorar la eficiencia productiva complementando las situaciones deficitarias en diferentes zonas y épocas del año, el estrés y la elevada concentración de animales pueden favorecer la difusión de enfermedades infectocontagiosas más rápidamente que en sistemas extensivos tradicionales. Se debe

tener en cuenta que actualmente el área destinada a la ganadería ha disminuido a expensas de la agricultura. De acuerdo al reporte de la Dirección de Estadísticas Agropecuarias (DIEA), las extensiones de campo destinadas a la ganadería han tenido una reducción significativa desde comienzos de la década de 1990 hasta 2011, situación que se ha desencadenado principalmente por un importante incremento de las áreas destinadas a la forestación y a la agricultura del secano (Dirección del Área de Estadísticas Agropecuarias 2015). Acompañando este escenario, la cría de rumiantes en nuestro país se encuentra actualmente desafiada por el incremento de la demanda de consumo, la necesidad de agregar valor a la producción y la exigencia de un marco normativo internacional orientado a la producción saludable y sustentable. Esto ha hecho que en los últimos años se hayan incrementado los sistemas ganaderos intensivos con el fin de mejorar los rendimientos en una menor área y en base a estrategias productivas sustentables. Por otra parte, más allá de aspectos coyunturales, el sector lechero se encuentra en un período de expansión productiva influenciada fuertemente por la creciente demanda en el consumo. Además, es importante destacar la importancia que tienen la producción de carne y leche para la economía del país, tanto para el consumo interno como para la exportación. En este contexto general, urge la necesidad de controlar los riesgos sanitarios asociados a los sistemas productivos en dichas cadenas.

Clasificación de la DNT

La DNT afecta principalmente terneros que se encuentran entre las 12 hs post-parto y los 35 días de vida aproximadamente y las manifestaciones clínicas se caracterizan por presencia de heces acuosas y profusas, deshidratación progresiva, decaimiento general, acidosis y en casos severos muerte en pocos días (Odeón 2001). De acuerdo a la situación clínica de los animales afectados, la DNT se clasifica en diarrea grave, diarrea moderada y diarrea leve. La diarrea grave requiere una rápida hidratación del animal y tratamiento de los síntomas, el cuadro es difícil de revertir y generalmente se llega a la muerte. Las alteraciones del medio interno conducen a la hipoglucemia, deshidratación severa y acidosis metabólica lo que finalmente lleva al shock hipovolémico y la muerte. Por otro lado, la diarrea moderada ocurre en terneros que cuando son atendidos inmediatamente con tratamientos hidratantes generalmente se recuperan, aunque puede ocurrir muerte en casos aislados (Margueritte *et al.* 2005; Lorenz *et al.* 2011).

Agentes etiológicos de la DNT

El síndrome diarreico neonatal tiene una etiología compleja debido a que varios agentes infecciosos pueden estar asociados a los brotes, tanto individualmente como en combinación dando lugar a co-infecciones. La prevalencia de cada patógeno y la incidencia de la enfermedad pueden variar entre las regiones geográficas donde se encuentran los rodeos. Además, las condiciones ambientales de los establecimientos, el número de animales por rodeo, los protocolos de manejo y la nutrición de los mismos pueden influenciar la severidad y el resultado de la enfermedad (Cho y Yoon 2014).

Los rotavirus, coronavirus, *Escherichia coli*, *Cryptosporidium parvum* y *Clostridium perfringens* suelen ser los 5 agentes infecciosos más comúnmente asociados a la diarrea neonatal, aunque recientemente se ha descrito también la presencia de *Salmonella* spp. y torovirus (Kirisawa *et al.* 2007; Foster y Smith 2009). Cabe destacar que estos agentes infecciosos pueden ser encontrados en muestras de heces de animales saludables, por lo que el desarrollo de la enfermedad dependerá de una relación desfavorable entre el estado del ternero y la presión por parte de los agentes infecciosos (Bartels *et al.* 2010). Los virus son considerados importantes agentes etiológicos de la DNT y suelen actuar como factor predisponente para infecciones bacterianas secundarias (Lorenz *et al.* 2011). Causan destrucción y atrofia de las células intestinales, provocando disfunción intestinal y mala absorción, con acumulación de leche parcialmente digerida en la luz intestinal y aumento de la presión osmótica que favorece el proceso diarreico (Lorenz *et al.* 2011). En países de la región como Argentina y Brasil el rotavirus bovino se encuentra ampliamente distribuido y la asociación con *C. parvum* y *E. coli* es motivo de importantes pérdidas en los primeros días de vida de los terneros (Bellinzoni *et al.* 1990; Salvadori *et al.* 2003; Margueritte *et al.* 2005).

***E. coli* y la DNT**

E. coli típicamente coloniza el tracto gastrointestinal de humanos y animales. Usualmente puede coexistir formando parte de la microbiota intestinal nativa y raramente causa enfermedad, excepto en hospederos inmunocomprometidos o cuando se altera la barrera gastrointestinal (Kaper *et al.* 2004). Sin embargo, existen variantes de *E. coli* altamente adaptadas, las cuales han adquirido atributos de virulencia que le permiten establecerse en distintos nichos y causar un amplio espectro de enfermedades en individuos sanos (Kaper *et al.* 2004). El criterio de clasificación

actual de *E. coli* se basa en patotipos, los cuales se diferencian de acuerdo a distintas combinaciones de sus propiedades de virulencia (adherencia, invasión y/o toxicidad). Particularmente se encuentran patotipos asociados a enfermedades entéricas/diarreicas (DEC) y asociados a enfermedades extraintestinales (ExPEC) (Kaper *et al.* 2004; Mainil 2013). Entre los patotipos que pueden causar enfermedades diarreicas encontramos *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* productora de Toxina-Shiga (STEC), *E. coli* necrotóxigénica (NTEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* de adherencia difusa (DAEC) y *E. coli* enteroagregativa (EAEC) (Kaper *et al.* 2004; Mainil y Fairbrother 2014). En particular, los patotipos EPEC, STEC, ETEC y EHEC pueden causar enfermedades en diferentes especies animales y se encuentran especialmente asociados a la DNT (Kaper *et al.* 2004; Nguyen *et al.* 2011; Mainil y Fairbrother 2014).

ETEC es considerado uno de los patotipos más importante como agente primario de diarrea en la primera semana de vida del ternero (Nagy y Fekete 1999; Nagy y Fekete 2005). La infección por ETEC se caracteriza por una diarrea acuosa, deshidratación progresiva, acidosis, pérdida de elasticidad de la piel, hundimiento de los ojos, debilidad, hipotermia, coma y muerte en casos muy severos (Foster y Smith 2009; Gyles y Fairbrother 2010). La habilidad para adherirse a la mucosa del intestino delgado está mediada por los factores de colonización fimbriales y fibrilares. Estas adhesinas se consideran importantes factores de virulencia ya que median su adherencia al íleon y le permiten transferir más efectivamente las enterotoxinas a las células intestinales (Nagy y Fekete 2005). Particularmente, las fimbrias más comúnmente expresadas en cepas de ETEC causantes de las diarreas en terneros son las fimbrias F4 (inicialmente denominada K88), F5 (inicialmente denominada K99), F41 y F17 entre otras (Franck *et al.* 1998; Nagy y Fekete 2005; Ok *et al.* 2009; Nguyen *et al.* 2011). Otro factor de virulencia que se destaca en ETEC es la producción de las enterotoxinas termolábil (LT) y termoestable (ST) y aunque tradicionalmente se consideraba que eran las únicas toxinas ETEC, hoy en día se conocen variantes de las mismas (Kaper *et al.* 2004; Mainil 2013). Las distintas cepas de ETEC se pueden caracterizar por expresar las distintas enterotoxinas individualmente o varias al mismo tiempo (Nagy y Fekete 2005). El mecanismo de acción general consiste en provocar hipersecreción de fluidos (H₂O, Na⁺ y Cl⁻) en el lumen intestinal y un concomitante descenso en la absorción de los mismos, llevando a deshidratación y acidosis (Nagy y Fekete 1999; Nagy y Fekete 2005).

EPEC y EHEC pertenecen a la familia de patógenos que producen lesiones llamadas de adhesión y borrado (A/E) en células del epitelio intestinal. Durante la colonización del tracto gastrointestinal la bacteria se adhiere a las células epiteliales causando cambios en el citoesqueleto de las mismas e induciendo la acumulación de actina polimerizada directamente debajo de la bacteria adherida. Consecuentemente las microvellosidades del intestino se “borran” y se forman estructuras “tipo pedestal” donde se encuentra la bacteria (Croxen y Finlay 2010). La habilidad de inducir estos cambios se encuentra codificada en la isla de patogenicidad LEE (del inglés *locus of enterocyte effacement*), la cual presenta homólogos en otros patógenos bacterianos de seres humanos y animales (Kaper *et al.* 2004). Asimismo, LEE codifica para una serie de proteínas entre las que se destaca la proteína de membrana externa intimina, la cual además de mediar la adhesión bacteriana a las células epiteliales estimula una respuesta inmune TH1 e induce hiperplasia de las células de la cripta del intestino en el hospedador (Higgins *et al.* 1999). El mecanismo general por el cual EPEC y EHEC causan diarrea involucra el sistema de secreción tipo 3 (SST3), el cual también se encuentra codificado en la isla de patogenicidad LEE. Particularmente la asociación cooperativa entre la intimina y otras proteínas del SST3 sería la desencadenante del borrado de las vellosidades intestinales (Kaper *et al.* 2004).

Las infecciones causadas por EPEC y EHEC suelen afectar distintas especies animales, especialmente neonatos de hasta una semana de edad. En general producen diarrea aguda y crónica moderada, y en algunos casos hemorrágicas, aunque se ha establecido que otros factores infecciosos y no infecciosos pueden influir en la severidad de la enfermedad (Gyles 2007; Gyles y Fairbrother 2010). Además, se ha propuesto que EPEC y EHEC obtenidos de rumiantes con diarrea presentan potencial zoonótico debido a que pertenecen a los mismos serogrupos que los patotipos que afectan humanos y tienen factores de virulencia asociados similares (Bardiau *et al.* 2010; Gyles y Fairbrother 2010; Moxley y Smith 2010; Hernández *et al.* 2011).

El patotipo EHEC también se caracteriza por la expresión de toxina Shiga Stx (también conocida como verotoxina VT), la cual se considera su factor de virulencia principal (Croxen y Finlay 2010). Stx es una toxina AB compuesta por 5 subunidades B responsables de la unión a la superficie celular y una subunidad A responsable de clivar el ARNr e interrumpir la síntesis proteica. Estas toxinas se encuentran codificadas en bacteriófagos tipo lambda y tienen la habilidad de inducir apoptosis en las células blanco en el intestino (Melton-Celsa 2015). Las toxinas Shiga se clasifican en 2 grupos: toxina Shiga 1 (Stx1) y toxina Shiga 2 (Stx2) dentro de los cuales se identifican

variantes. El grupo Stx2 es más heterogéneo y más prevalente en casos de colitis hemorrágica (CH) y síndrome urémico hemolítico (HUS) que Stx1 (Croxen y Finlay 2010). Stx se produce en el colon y viaja a través del torrente sanguíneo hasta el riñón donde daña las células endoteliales y altera la microvasculatura, además de inducir apoptosis en células epiteliales intestinales (Jones *et al.* 2000).

Es importante destacar que aunque muchas cepas de *E. coli* pueden producir la toxina Stx, muchos no contienen la isla de patogenicidad LEE. Este grupo se ha clasificado como el patotipo STEC (Kaper *et al.* 2004). En particular, el patotipo STEC se encuentra en el rumen y en el intestino de animales sanos formando parte de la microbiota intestinal (Nataro y Kaper 1998; Caprioli *et al.* 2005; Croxen y Finlay 2010), aunque se ha asociado a episodios de diarrea en terneros jóvenes a través del efecto citotóxico de las toxinas que produce (Wieler *et al.* 1998; Mainil y Fairbrother 2014). Asimismo, estudios realizados en Europa han demostrado que la prevalencia de STEC en heces de terneros jóvenes puede ser muy elevada, y se ha reportado que STEC pueden sobrevivir en el ambiente y en el suelo por meses, así como contaminar alimentos, fuentes subterráneas de agua y leche (Duffy y McCabe 2015). Estas características hacen de STEC un patotipo de alto riesgo como patógeno zoonótico. El espectro de enfermedades asociadas puede variar desde diarreas leves hasta CH y SUH particularmente en niños (Tozzoli y Scheutz 2014). En algunas regiones de Brasil las infecciones causadas por STEC constituyen un importante problema de salud pública (Guth *et al.* 2010); mientras que en Argentina, país donde el SUH es endémico, las infecciones por STEC son consideradas un serio problema de salud (Rivas *et al.* 2015). De hecho, importantes brotes asociados a STEC se han reportado en el mundo, comenzando en 1982 con un importante brote de CH en USA por una cepa de EHEC O157:H7 (Riley *et al.* 1983) y llegando hasta Alemania en 2011, con una epidemia causada por una cepa inusual de STEC O104:H4 (Scheutz 2011).

Los patotipos NTEC y DAEC también están asociados a diarrea en animales (Mainil 2013). NTEC se define por la producción de factores necrotizantes citotóxicos (CNFs, del inglés *cytotoxic necrotizing factors*) así como varias adhesinas fimbriales y no fimbriales. En particular la variante NTEC1 es responsable de infecciones diarreogénicas y de infecciones extraintestinales (De Rycke *et al.* 1999). Por otro lado, la adherencia difusa del patotipo DEAC estaría mediada por la adhesina AIDA, la cual también se encuentra en ETEC y STEC. En particular, este patotipo ha sido descrito tanto en infecciones diarreogénicas como extraintestinales en humanos y también en animales (Gyles y Fairbrother 2010).

Detección y diagnóstico de DNT

Teniendo en cuenta que la severidad de la DNT puede desencadenar en la muerte de los terneros, que varios patógenos pueden estar implicados en la enfermedad y que el progreso de la misma puede ser muy rápido es esencial identificar rápidamente dichos patógenos (Cho y Yoon 2014). En particular, los clínicos veterinarios y los productores necesitan realizar distintos métodos confirmatorios rápidos, utilizando técnicas diagnósticas adecuadas que les permitan implementar intervenciones eficaces en los rodeos (Cho y Yoon 2014).

En general, el diagnóstico etiológico de la DNT se basa en la identificación de los agentes en las heces de los terneros diarreicos y/o a partir de muestras obtenidas por necropsias. El procedimiento para diagnosticar DNT tiene varios elementos a tener en cuenta. Primeramente, es importante determinar los signos clínicos de los animales y los antecedentes de los establecimientos donde se estén suscitando episodios de DNT. Por otro lado, es clave la detección de los agentes etiológicos y la identificación de irregularidades en el manejo de los animales y en la sanidad de los establecimientos, factores que pudieran estar desencadenando la ocurrencia de la enfermedad (Lorenz *et al.* 2011).

Entre las técnicas descritas en la literatura para la detección de agentes etiológicos se incluyen la aglutinación en látex, que se destaca por ser muy económica, la microscopía electrónica, muy utilizada para la detección de virus no cultivables, pero que cuenta con la desventaja de ser poco específica, la técnica inmunohistoquímica en casos de necropsias, el ELISA para detección de antígenos, el cual tiene las ventajas de ser muy rápido y con alto rendimiento y finalmente PCR convencional (a tiempo final) y PCR en tiempo real. Estas últimas, permiten una rápida detección de los patógenos con alta especificidad y sensibilidad (Cho y Yoon 2014). La identificación de genes de virulencia de los enteropatógenos causantes de DNT como por ejemplo *E. coli* mediante la técnica de PCR, ha permitido en los últimos años detectar la presencia de este patógeno entérico en distintos rodeos y regiones, tanto el patotipo ETEC como los patotipos EHEC, STEC y EPEC (Ok *et al.* 2009; Nguyen *et al.* 2011).

Prevención y tratamiento

Manejo y nutrición

Un paso importante en la prevención de la DNT es identificar los factores de riesgo y establecer procedimientos para corregir factores que estén asociados al manejo, nutrición e higiene de los animales y a las condiciones del establecimiento donde se encuentran dichos terneros. Muchas veces la prevención de la enfermedad no es posible en sistemas intensivos. Por lo tanto, la incidencia y tasa de mortalidad dependerán del grado de exposición a los agentes infecciosos y el estado del ternero (Lorenz *et al.* 2011). En relación a esto último, existen principios básicos que deberán ser aplicados en los rodeos donde se identifique el problema. El primero de ellos consiste en reducir la exposición de los neonatos a los agentes infecciosos, lo que se consigue a través de buenas prácticas de manejo y buscando que los animales permanezcan en ambientes con reducida contaminación. El segundo factor importante a tener en cuenta es el estrés ambiental. Condiciones severas con bajas o altas temperaturas, nevadas, vientos, lluvia intensa y prolongada y alta humedad favorecen el aumento del estrés de los animales. Los neonatos son incapaces de regular la temperatura en condiciones extremas, lo que puede llevar a hipotermia o hipertermia y por lo tanto a una respuesta inmune no efectiva. Teniendo en cuenta esto, y en la medida de lo posible, se recomienda manipular las épocas de partos, buscando que ocurran en fechas más benévolas (Cho y Yoon 2014). Finalmente, el tercero de los principios consiste en proporcionar resistencia no específica a través de un nivel nutricional adecuado con correcto consumo del calostro en las primeras horas de vida. El adecuado consumo de calostro es considerado por varios autores la medida más importante para la prevención de la DNT, aunque muchas veces es interrumpido en sistemas de producción intensivos (Meganck *et al.* 2014). Dado que la placenta bovina no permite la transferencia pasiva de anticuerpos al feto y que el neonato al momento del nacimiento se encuentra muy susceptible a los patógenos en el ambiente, el consumo del calostro resulta vital (Lorenz *et al.* 2011; Cho y Yoon 2014; Meganck *et al.* 2014). Esta inmunidad pasiva juega un papel en la reducción del riesgo de mortalidad en poblaciones donde previamente se ha establecido un alto riesgo de muerte (Windeyer *et al.* 2014). La resistencia a patógenos entéricos no sólo depende del consumo de calostro, sino también del tiempo entre el nacimiento y el consumo, del volumen y de la calidad nutricional del mismo. El consumo de calostro es esencial en las primeras 24 hs de vida del ternero. En particular, en las primeras 6 hs se necesitan alrededor de 2-3 litros para los terneros de carne y entre 3-4 litros para los terneros de

leche (Cortese 2009). Asimismo, la calidad del calostro también es importante, ya que contiene anticuerpos, células inmunes (neutrófilos, macrófagos, células T y células B), complemento, lactoferrina, factores de crecimiento e interferón, entre otros factores solubles y nutrientes claves (azúcares, grasas y vitaminas) para el desarrollo de los terneros (Kehoe *et al.* 2007). Independientemente del consumo del calostro, la administración de una terapia rehidratante oral es especialmente recomendada cuando se detectan signos de diarrea entre los terneros. La terapia electrolítica es considerada una herramienta fundamental ya que la elección de una solución hidratante correcta y efectiva es esencial para la recuperación del animal. El objetivo de estas terapias consiste en reponer los electrolitos y fluidos perdidos producto de la enfermedad que están atravesando las animales (Michell 2005). Es un tratamiento que debe prolongarse hasta que los signos del animal hayan desaparecido totalmente. Asimismo y teniendo en cuenta que la acidosis es una complicación severa asociada a la DNT, la terapia hidrolítica se utiliza para corregir esta complicación (Lorenz *et al.* 2011). Es importante resaltar que para que la terapia hidrolítica sea efectiva siempre debe ir acompañada por la dieta habitual de los terneros (Lorenz *et al.* 2011). Finalmente, en casos extremos, cuando los animales están severamente deprimidos, deshidratados (> 8 %) y anoréxicos (< 24 hs) se emplea la terapia de fluidos en forma intravenosa (Berchtold 2009).

Vacunación

La vacunación es una estrategia utilizada para prevenir la DNT. Actualmente es muy común que se recurra a la vacunación de hembras gestantes de forma de aumentar la resistencia de los neonatos (Margueritte *et al.* 2005). Esta estrategia induce una alta producción de anticuerpos específicos en la hembra gestante los cuales se transmiten al ternero luego del nacimiento, a través del calostro. Estas vacunas se administran de forma parenteral, entre el 7º y 8º mes de gestación (Nagy y Fekete 2005) y en general protegen contra los principales agentes virales y bacterianos, aunque no contra todos los agentes causantes. Existen en el mercado varias vacunas contra la DNT, las cuales frecuentemente contienen bacterina o fimbrias purificadas de *E. coli* en conjunto o no, con toxoide LT de ETEC, así como distintos antígenos virales. Entre los antígenos bacterianos más comúnmente encontrados en estas vacunas está la fimbria F5 de *E. coli* (Nagy y Fekete 2005). Es importante resaltar que la protección pasiva decrece con la edad y cesa cuando el ternero es destetado. Esta circunstancia podría tener importantes implicancias en la efectividad de las vacunas, pero como se

mencionó anteriormente, las infecciones por ETEC (principal patotipo de *E. coli* asociado a DNT) ocurren en general en la primera semana de vida del ternero. Por otro lado, cuando los terneros son separados de las madres a muy temprana edad, su inmunidad se encontraría más comprometida ya que las cantidades de anticuerpos transmitidos no serían las adecuadas (Cox *et al.* 2014). Finalmente, cabe recordar que en la DNT participan varios agentes etiológicos y es posible que el agente causante de la diarrea en un rodeo no se encuentre contenido en una vacuna particular.

Otra estrategia de vacunación actualmente en estudio tiene como objetivo prevenir la colonización intestinal de *E. coli* O157:H7 y de esa forma, disminuir su dispersión en el ambiente. Como se mencionó anteriormente, STEC y EHEC son importantes patógenos zoonóticos, siendo los terneros los principales reservorios y diseminadores (Caprioli *et al.*, 2015). En este sentido un amplio espectro de proteínas blanco para el desarrollo de vacunas están siendo evaluadas. Entre ellas se destacan las proteínas EspA, EspB y Tir, todas componentes del SST3, la flagelina H7 y la porina receptora de sideróforo SRP (Cox *et al.* 2014). Si bien se han logrado reducir las prevalencias de terneros portadores de STEC O157, en condiciones naturales la eficacia de la vacunación no es tan clara y dependería de cómo los productos son administrados en los animales (Smith *et al.* 2009). Para mejorar la eficacia de las mismas sería necesario realizar más ensayos a campo que simulen las condiciones naturales en los rodeos (Smith *et al.* 2009).

Antibioticoterapia y metafilaxis

La utilización de antibióticos es una estrategia frecuente en veterinaria para el tratamiento de diversas infecciones, incluyendo la DNT. Si bien esta estrategia disminuye la mortalidad de los terneros en los rodeos y se los considera una solución para enfrentar muchos problemas sanitarios suscitados, por otro lado promueve la selección de cepas bacterianas multirresistentes. Lamentablemente el uso indiscriminado de antibióticos se ha acompañado de un aumento en las resistencias, acarreando importantes problemas de salud así como grandes pérdidas económicas en el sector productivo en los últimos años (Constable 2004). En este sentido, actualmente se recomienda en la clínica veterinaria el uso prudente de los mismos, algo que también se busca en la clínica humana. Entre las estrategias planteadas a los veterinarios se establece que sólo se utilicen antibióticos para tratar animales que cursen una infección sistémica, con marcada depresión, anorexia y fiebre y que se

realicen ensayos de susceptibilidad de rutina en los rodeos (Constable 2004; Berge *et al.* 2006). Por otro lado, se está llegando al consenso de no recomendar la utilización de antibióticos como medida metafilática en rodeos donde se sospecha una infección bacteriana, ni tampoco la administración de antibióticos en dosis subterapéuticas a los terneros como "promotores del crecimiento" (Berge *et al.* 2006; Meganck *et al.* 2014). Ambas estrategias fueron muy utilizadas por décadas y ya están prohibidas en algunas partes del mundo (Berge *et al.* 2006). En particular, se ha demostrado que la metafilaxis podría incluso aumentar el riesgo de diarrea en terneros que reciben antibióticos a través de la leche en las primeras 2 semanas de vida, respecto a terneros que no reciben dicho tratamiento (Berge *et al.* 2009).

Los principales antibióticos utilizados actualmente a nivel veterinario incluyen miembros de la familia de β -lactámicos, aminoglucósidos, fluoroquinolonas, tetraciclinas y cloranfenicol (Constable 2004). Los primeros 3 grupos son también ampliamente utilizados para el tratamiento de distintos procesos infecciosos en el ser humano, por lo que la presión de selección ejercida por su utilización a nivel veterinario podría tener un impacto directo en la salud pública, ya sea por la ocurrencia de residuos de antibióticos en alimentos sin procesar o semi-procesados, por la transmisión de bacterias resistentes entre diferentes huéspedes o incluso por la movilización de elementos genéticos de resistencia entre microorganismos (Chen *et al.* 2012). Algunos ejemplos se reportan en trabajos en los que se han detectado restos de ciprofloxacina en productos derivados de animales de consumo como leche, pescado, riñones, hígado de ternero, gallina y cerdo (Chen *et al.* 2012).

La asociación de dichos mecanismos de resistencia a antibióticos a elementos genéticos móviles o movilizadores como plásmidos, integrones, transposones o secuencias de inserción favorecen la diseminación horizontal de los genes de resistencia (Tenover 2006). Por ejemplo, tradicionalmente se pensaba que la transferencia de resistencia a quinolonas se adquiría por mutaciones cromosomales, sin embargo, en los últimos años se ha determinado la ocurrencia de resistencia a quinolonas transferibles mediadas por plásmidos (PMQR, del inglés *plasmid-mediated quinolone resistance*), situación que permite la transferencia de resistencia a ese grupo de antibióticos rápidamente entre bacterias. Desde su primera descripción por Martínez-Martínez y colaboradores (1998) la detección de determinantes de Qnr (QnrA, QnrB, QnrC, QnrD, QnrS, QepA y Aac(6')-Ib-cr) se ha expandido a todas partes del mundo, en bacterias obtenidas de muestras clínicas como de origen animal (Tenover 2006; Kirchner *et al.* 2011), incluyendo en muestras de origen clínico en Uruguay (Bado

et al. 2010). La resistencia transferible a β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) también ha sufrido una fuerte expansión en los últimos años. Tal es así, y teniendo en cuenta que se las puede encontrar asociadas a integrones, transposones y plásmidos, que se considera una situación de pandemia respecto a ellas (Cantón y Coque 2006). Principalmente las BLEE pueden conferir resistencia a distintos antibióticos β -lactámicos entre los que se destacan las penicilinas, las cefalosporinas de primera, segunda y tercera generación, los monobactámicos y las carbapenemasas (Cantón y Coque 2006). Finalmente se destaca la presencia de los Integrones. Estos elementos genéticos pueden portar diversos arreglos de genes, los cuales se pueden transferir rápidamente gracias a la gran variedad de secuencias de recombinación que presentan (Di Conza y Gutkind 2010). En particular los integrones de clase 1 son asociados a aislamientos multirresistentes a antibióticos y se los puede encontrar en muestras clínicas, ambientales y de origen animal (Nastasi y Mammina 2001; Nield *et al.* 2001; Nandi *et al.* 2004; Ahmed *et al.* 2007).

Pese a la relevancia veterinaria y clínica humana de los efectos del uso indiscriminado de antibióticos que se expuso anteriormente, en Uruguay no se dispone de datos a nivel nacional asociados al tema en bovinos.

HIPÓTESIS

La presencia de factores de virulencia de *E. coli* aisladas de bovinos en Uruguay está asociada a la ocurrencia DNT. Los aislamientos de *E. coli* recuperados de terneros, ya sea de animales afectados con DNT o de animales sanos presentan atributos de virulencia y características moleculares que los agrupan en perfiles genéticos y secuenciotipos. La presión de selección debida al uso de antibióticos en la clínica veterinaria lleva a un aumento en la resistencia a los mismos, los cuales se pueden asociar a mecanismos transferibles y elementos genéticos móviles capaces de movilizar resistencias entre bacterias.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la presencia, diversidad, distribución, características de virulencia y multirresistencia a antibióticos de *Escherichia coli* causante de DNT en nuestro país por medio de distintas aproximaciones moleculares y estudiar la interacción bacteriana con el hospedador en etapas de adhesión y citotoxicidad.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Capítulo 1 – Caracterización fenotípica y molecular de la colección de aislamientos de *E. coli*

- i. Generar una colección de cepas de *E. coli* aisladas de muestras de heces provenientes de terneros sanos y enfermos de menos de 35 días de edad en sistemas de producción extensivos e intensivos.
- ii. Caracterizar la colección de aislamientos de *E. coli* y confirmar la identidad de los mismos mediante amplificación específica del gen que codifica para el ARNr 16S de *E. coli*.
- iii. Determinar la presencia y distribución de genes asociados a virulencia de *E. coli*.

Capítulo 2 – Diversidad genética, estructura poblacional y resistencia a antimicrobianos de la colección de aislamientos de *E. coli*

- i. Evaluar la diversidad intra-específica de la colección mediante REP-PCR.
- ii. Estudiar la estructura poblacional de una selección de aislamientos por MLST.
- iii. Analizar los perfiles de resistencia a antimicrobianos de la colección, así como la presencia de elementos genéticos móviles y mecanismos de resistencias transferibles.

Capítulo 3 – Interacción bacteriana con el hospedero: citotoxicidad, adhesión, expresión de adhesinas y formación de *biofilms*

- i. Evaluar las propiedades de adhesión de aislamientos de *E. coli* en cultivos de células Hep-2.
- ii. Caracterizar la capacidad de formar *biofilms* de los aislamientos de *E. coli* *in vitro*.
- iii. Estudiar la expresión *in vitro* de la adhesina CS31A en aislamientos de *E. coli*.
- iv. Evaluar el efecto citotóxico de los aislamientos de *E. coli* en cultivos de células VERO.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Aislamientos bacterianos

1.1 Elaboración de formulario

En este trabajo se analizaron muestras de heces de terneros menores de 35 días de edad con y sin síntomas clínicos de diarrea neonatal, tanto de establecimientos dedicados a la cría de ganado de carne como dedicados a lechería.

Previo a la obtención y recepción de heces de terneros, se elaboró un formulario para la identificación de las muestras con el fin de generar una base de datos (Anexo I). Dicho formulario incluyó parámetros sanitarios del animal del cual provenían las muestras como presencia de síntomas de diarrea al momento de la toma y ocurrencia de tratamiento electrolítico, edad, procedencia, condiciones de cría (extensiva o intensiva) y un espacio para otras observaciones generales que fueran consideradas relevantes al momento de la colecta. Al personal encargado de la recolección se le proveyó con el material necesario que incluyó frascos estériles, guantes, refrigerantes y conservadoras aislantes para el transporte de las muestras.

1.2 Recepción de muestras y siembra de heces

Las muestras de heces fueron colectadas y remitidas refrigeradas a nuestro Departamento y procesadas en un lapso máximo de 12 hs. El período de toma de muestras fue de un año, entre Agosto de 2012 y Agosto de 2013. No obstante, se recibieron muestras en Enero de 2014, correspondientes a un caso muy severo de DNT en el Departamento de Artigas.

Una vez en el laboratorio, la manipulación de las heces se realizó en cabina de flujo laminar (Nivel de Bioseguridad II). Todas las muestras se sembraron por ansada en placas de medio selectivo Mac Conkey (Oxoid) durante 24 ± 2 hs a 37°C . Luego de la siembra, las heces fueron autoclavadas de manera de disminuir la exposición de los investigadores del laboratorio.

Transcurrido el tiempo de incubación, se seleccionaron hasta 5 colonias lactosa positivas de cada una de las muestras, las cuales se repicaron a placas de medio Triptona Soya Agar (TSA) para su posterior identificación y almacenamiento.

1.3 Cultivo rutinario de los aislamientos de *E. coli* y almacenamiento

El cultivo rutinario de los aislamientos se realizó en placas de medio TSA o en caldo Soya Triptona (TSB) con una incubación entre 18-24 hs a 37 °C. Todas las colonias identificadas como *E. coli* se almacenaron a -20 °C y a -80 °C en medio TSB conteniendo 15 % de glicerol estéril final.

1.4 Identidad de los aislamientos

1.4.1 Identificación fenotípica y morfológica

Para la identificación fenotípica de *E. coli* se realizaron las pruebas bioquímicas estándar de Indol, Voges-Proskauer, crecimiento en medio EC, utilización de citrato, OF-glucosa, actividad oxidasa y actividad catalasa. Todas las pruebas bioquímicas se realizaron a partir de colonias aisladas de cultivos de 18-24 hs en TSA a 37 °C, excepto para la prueba de citrato donde la incubación fue hasta las 72 hs a 37 °C y el crecimiento en medio EC que fue hasta las 48 hs a 45 °C. Todos los medios de cultivo fueron de la marca comercial Oxoid. Una cepa de *Klebsiella pneumoniae* y otra de *Pseudomonas aeruginosa* pertenecientes al Cepario del Departamento se emplearon como controles en las pruebas bioquímicas. Para evaluar la morfología bacteriana se realizó la tinción de Gram y la ocurrencia de movilidad *swarming* se observó en cultivos de medio TSA.

1.4.2 Identificación molecular

La confirmación de la identidad de los aislamientos se realizó mediante amplificación de un fragmento del gen que codifica al ARNr 16S por PCR, utilizando los cebadores universales 27F (5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3') y 1492R (5'-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3') diseñados por Weisburg y colaboradores (1991). Se utilizó el Termociclador LabNet y se preparó una mezcla de reacción de 0,2 mM de dNTPs, 3,0 mM de MgCl₂, 15mM de cada cebador, 4,8 ng/μl de ADN y 1 U de la enzima Taq polimerasa (Invitrogen), en un volumen final de 25 μl. El protocolo de ciclado consistió en 3 min a 94 °C, 30 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 50 °C y 1,5 min a 72 °C, para finalizar con 10 min a 72 °C y posterior mantenimiento a 4 °C.

Los productos de PCR amplificados se analizaron por electroforesis en geles de agarosa 0,8 %, se tiñeron con GelRed (Biotum) y se observaron bajo luz UV. El tamaño de los amplicones se determinó mediante comparación con el marcador de tamaño 1

kb Plus (Thermo Scientific). Para confirmar la identidad de los aislamientos se secuenciaron los productos de PCR generados en el servicio de secuenciación brindado por MacroGen (Corea). El alineamiento y los análisis de las secuencias obtenidas se realizaron con el programa bioinformático BioEdit (versión 7.5.0.3) y los programas en línea BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y *Ribosomal Database Project* (RDP) (<http://rdp.cme.msu.edu/>) utilizando la herramienta *Classifier* (Wang *et al.* 2007). Con el fin de estudiar la filogenia de los aislamientos se realizaron árboles filogenéticos utilizando el método de máxima verosimilitud (ML, del inglés *Maximum likelihood*) empleando el programa MEGA versión 7.0.18. y el modelo de Kimura con 2 parámetros (1980).

2. Identificación de genes asociados a virulencia

La identificación de genes de virulencia de *E. coli* se llevó a cabo por PCR a tiempo final. Se pusieron a punto distintos protocolos de PCR para la identificación de los genes *clpG* (codifica para la subunidad mayor de la adhesina no fimbrial CS31A), *f17A*, *f17G(I)* y *f17G(II)* (codifican para la subunidad estructural y las 2 familias de adhesinas de la fimbria F17 respectivamente), *f5* (codifica para la subunidad estructural de la fimbria F5), *stx1* y *stx2* (codifican para las toxinas tipo Shiga 1 y 2), *eae* (codifica para la intimina), *estA* (codifica para la enterotoxina termoestable), *elt* (codifica para la enterotoxina termolábil).

El ADN se extrajo por el método de lisis térmica. Una colonia aislada de cada aislamiento se resuspendió en 1 ml de agua destilada y se incubó a 95 °C durante 10 minutos. A continuación, se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 min para separar los restos celulares del ADN y el sobrenadante se almacenó a -20 °C. La cuantificación del ADN purificado se realizó en Nanodrop (Thermo Scientific). La composición de la mezcla de reacción y el ciclado del PCR se detallan en la Tabla 1. En todos los casos, los productos de PCR se analizaron en geles de agarosa 0,8 % - 1,2 %, teñidos con GelRed (Biotum) y se observaron bajo luz UV. Para determinar el tamaño de los amplicones se utilizó el marcador 1 kb Plus (Thermo Scientific). Luego de las amplificaciones, se seleccionó un producto de PCR del tamaño esperado para cada gen y se secuenció en MacroGen (Corea) para confirmar su identidad. El alineamiento y los análisis de secuencias se realizaron con el programa bioinformático BioEdit (versión 7.5.0.3) y el programa en línea BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Tabla 1. Cebadores, mezclas de reacción y ciclado para la amplificación de los genes de virulencia de *E. coli* por PCR simple a tiempo final; y con cada par de cebadores en mezclas de reacción diferentes. (*) Amplificación de *estA* y *elt* realizada por PCR múltiple.

Cebador	Secuencia (5'--3')	Posición	Tamaño (pb)	Mezcla de reacción (vol. final 25 µl)	Ciclado	Referencia							
clpG-F	GGGCGCTCTCTCCTTCAAC	153-172	403	0,1 mM de dNTPs, 1,5 mM de MgCl ₂ , 0,32 µM de cada cebador, 2 ng/µl de ADN, 1 U de Taq Polimerasa y 1x de <i>buffer</i> de la enzima.	5 min a 94 °C, [1 min a 94 °C, 1 min a 61,7 °C , 1 min a 72 °C] x 30, extensión 10 min a 72 °C	Bertin <i>et al.</i> 1998							
clpG-R	CGCCCTAATTGCTGGCGAC	537-556											
f17A-F	GCAGAAAATTCAATTTATCCTTGG	3-26	537		0,1 mM de dNTPs, 1,5 mM de MgCl ₂ , 0,32 µM de cada cebador, 2 ng/µl de ADN, 1 U de Taq Polimerasa y 1x de <i>buffer</i> de la enzima.	5 min a 94 °C, [1 min a 94 °C, 1 min a 59 °C , 1 min a 72 °C] x 30, extensión 10 min a 72 °C	Bertin <i>et al.</i> 1996						
f17A-R	CTGATAAGCGATGGTGAATTAAC	517-540											
f17G(I)-F	CGGAGCTAATACTGCATCAACC	399-420	615			0,1 mM de dNTPs, 1,5 mM de MgCl ₂ , 0,32 µM de cada cebador, 2 ng/µl de ADN, 1 U de Taq Polimerasa y 1x de <i>buffer</i> de la enzima.	5 min a 94 °C, [1 min a 94 °C, 1 min a 60,7 °C , 1 min a 72 °C] x 30, extensión 10 min a 72 °C	Bertin <i>et al.</i> 1996					
f17G(I)-R	TGTTGATATTCCGTTAACCGTAC	992-1014											
f17G(II)-F	CGTGGGAAATTATCTATCAACG	396-417	618				0,1 mM de dNTPs, 1,5 mM de MgCl ₂ , 0,32 µM de cada cebador, 2 ng/µl de ADN, 1 U de Taq Polimerasa y 1x de <i>buffer</i> de la enzima.	5 min a 94 °C, [1 min a 94 °C, 1 min a 58 °C , 1 min a 72 °C] x 30, extensión 10 min a 72 °C	Bertin <i>et al.</i> 1996				
f17G(II)-R	TGTTGATATTCCGTTAACCGTAC	992-1014											
f5-F	TATTATCTTAGGTGGTATGG	21-40	314					0,1 mM de dNTPs, 1,5 mM de MgCl ₂ , 0,32 µM de cada cebador, 2 ng/µl de ADN, 1 U de Taq Polimerasa y 1x de <i>buffer</i> de la enzima.	5 min a 94 °C, [1 min a 94 °C, 1 min a 58 °C , 1 min a 72 °C] x 30, extensión 10 min a 72 °C	Roosendaal <i>et al.</i> 1987			
f5-R	GGTATCCTTTAGCAGCAGAGTATTC	311-334											
eae-F	GGGATCGATTACCGTCAT	26010-26027	837	0,2 mM de dNTPs, 3,0 mM de MgCl ₂ , 0,1 µM de cada cebador, 5 ng/µl de ADN, 1 U de Taq Polimerasa y 1x de <i>buffer</i> de la enzima.					5 min a 94 °C, [1 min a 94 °C, 1 min a 53 °C , 1 min a 72 °C] x 30, extensión 5 min a 72 °C	Batchelor <i>et al.</i> 1999			
eae-R	TTTATCAGCCTTAATCTC	26832-26847											
stx1-F	CAGTTAATGTGGTGGCGAAGG	213-232	348		0,2 mM de dNTPs, 3,0 mM de MgCl ₂ , 0,1 µM de cada cebador, 5 ng/µl de ADN, 1 U de Taq Polimerasa y 1x de <i>buffer</i> de la enzima.					5 min a 94 °C, [1 min a 94 °C, 1 min a 53 °C , 1 min a 72 °C] x 30, extensión 5 min a 72 °C	Cebula <i>et al.</i> 1995		
stx1-R	CACCAGACAATGTAACCGCTG	538-559											
stx2-F	ATCCTATTCCGGGAGTTTACG	295-316	584			0,2 mM de dNTPs, 3,0 mM de MgCl ₂ , 0,1 µM de cada cebador, 5 ng/µl de ADN, 1 U de Taq Polimerasa y 1x de <i>buffer</i> de la enzima.					5 min a 94 °C, [1 min a 94 °C, 1 min a 53 °C , 1 min a 72 °C] x 30, extensión 5 min a 72 °C	Cebula <i>et al.</i> 1995	
stx2-R	GCGTCATCGTATACACAGGAGC	859-881											
est-F	GCTAATGTTGGCAATTTTATTTCTGTA	9-36	190				0,26 mM de dNTPs, 2,6 mM de MgCl ₂ , 0,4 µM de cada cebador est, 0,48 µM de cada cebador elt, 10 ng/µl de ADN, 1,25 U de Taq Polimerasa y 1x de <i>buffer</i> de la enzima. (*)					6 min a 94 °C, [50 seg a 94 °C, 40 seg a 57 °C , 50 seg a 72 °C] x 35, extensión 3 min a 72 °C	Franck <i>et al.</i> 1998
est-R	AGGATTACAACAAAGTTCACAGCAGTAA	171-198											
elt-F	ATTTACGGCGTTACTATCCTG	27-48	280					0,26 mM de dNTPs, 2,6 mM de MgCl ₂ , 0,4 µM de cada cebador est, 0,48 µM de cada cebador elt, 10 ng/µl de ADN, 1,25 U de Taq Polimerasa y 1x de <i>buffer</i> de la enzima. (*)				6 min a 94 °C, [50 seg a 94 °C, 40 seg a 57 °C , 50 seg a 72 °C] x 35, extensión 3 min a 72 °C	Olive 1989
elt-R	TTTTGGTCTCGGTCAGATATG	286-307											

3. Diversidad intra-específica

3.1 *rep*-PCR y patrones de DNA-*fingerprinting*

La diversidad intra-específica de los aislamientos de *E. coli* se analizó empleando la técnica de *rep*-PCR (Versalovic *et al.* 1994) previamente utilizada en nuestro laboratorio para evaluar la diversidad de patógenos de origen apícola y bovino (Antúnez *et al.* 2007; Sosa y Zunino 2013). Previo a comenzar los análisis de diversidad, se extrajo el ADN total de cada uno de los aislamientos con el kit comercial *GenElute Bacterial Genomic DNA kit* (Sigma), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La cuantificación del ADN purificado se realizó en Nanodrop (Thermo Scientific).

Para la amplificación por PCR se utilizaron los cebadores ERIC-1 y ERIC-2 (Tabla 2) y el termociclador Optimax (Labnet) con las siguientes condiciones de ciclado: 5 min a 94 °C, [1 min a 94 °C, 2 min a 40 °C y 8 min a 65 °C] x 40 ciclos y una extensión final de 16 min a 65 °C. La mezcla de reacción consistió en 0,2 mM de dNTPS, 5 mM de MgCl₂, 3,0 μM de cada cebador, 4ng/μl de ADN, 1 U de Taq Polimerasa (Invitrogen) 1x de *buffer* de la enzima. La corrida electroforética de los productos de amplificación se realizó en geles de agarosa 1 % y 110V durante 3 hs. Para la observación de las bandas los geles se incubaron durante 40 min en colorante GelRed (Biotum), se lavaron 5 min en agua destilada y se visualizaron las bandas bajo luz UV. Para conocer el tamaño de los amplicones se utilizó el marcador 1 Kb Plus (Thermo Scientific). El análisis de los patrones de bandas se realizó con el programa bioinformático GelCompar II (Applied Maths, Versión 6.5). A partir de las bandas obtenidas se construyeron dendogramas utilizando el Método UPGMA y el coeficiente Dice, con un optimización del 3 % y una tolerancia del 1 %. Aquellos aislamientos que presentaron un porcentaje de similitud ≥ 98 % se consideraron la misma cepa, y aquellos aislamientos que presentaron un porcentaje de similitud ≥ 75 % se consideraron pertenecientes a una misma variante genética (Chandran y Mazumder 2014).

Tabla 2. Cebadores empleados en la técnica de *rep*-PCR

Cebadores	Secuencia 5'--- 3'	Referencia
ERIC-1	ATGTAAGCTCCTGGGGATTCAAC	Versalovic <i>et al.</i> 1994
ERIC-2R	AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCCG	

3.2 *Multilocus Sequence Typing* (MLST)

La estructura poblacional se analizó con la técnica de *Multilocus Sequence Typing* (MLST). De acuerdo a lo establecido en The Warwick Medical School, *Escherichia coli* MLST Database (<http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/>), se amplificaron parcialmente los genes *housekeeping adk* (adenilato kinasa), *fumC* (fumarasa C), *gyrB* (subunidad b de la ADN girasa), *icd* (isocitrato deshidrogenasa), *mdh* (malato deshidrogenasa), *purA* (adenil succinato sintetasa) y *recA* (RecA) de *E. coli* por PCR a tiempo final. La mezcla de reacción, el protocolo de ciclado para cada gen y la secuencia de cada cebador se detallan en la Tabla 3. Una alícuota de cada producto se analizó en geles de agarosa 1 %, teñidos con GelRed (Biotum) y se observaron bajo luz UV. Para la determinación de los tamaños de los amplicones se incluyó en cada corrida electroforética el marcador 1 kb Plus (Thermo Scientific).

Los productos de amplificación de los 7 genes evaluados se enviaron para su purificación y secuenciación a Macrogen (Corea). Una vez obtenidas las secuencias nucleotídicas, se editaron mediante el programa bioinformático Bioedit (versión 7.5.0.3) de acuerdo a lo estipulado en la página web de la Universidad de Warwick y se cargaron a la base de datos (<http://mlst.warwick.ac.uk>) para determinar los alelos de cada gen. En aquellos casos en los cuales todos los alelos de los genes estaban previamente descritos, automáticamente se le asignó un ST conocido al aislamiento. Por otro lado, cuando la combinación de alelos conocidos no estaba presente, a nuestros aislamientos se les asignó un nuevo ST.

A continuación, se realizaron análisis filogenéticos de los aislamientos mediante el concatenado de las secuencias de los 7 genes *housekeeping* estudiados. Para el alineamiento múltiple de las secuencias se utilizó el MEGA (versión 6.06) y para la generación del dendograma se empleó el método de *Neighbor-Joining* con un número de replicaciones de *bootstrap* de 1000.

Tabla 3. Cebadores, mezcla de reacción y ciclado para MLST.

Gen	Secuencia cebadores (5'--3')	Mezcla de reacción (vol. final 50 µl)	Annealing (°C)	Ciclado	Tamaño (pb)	
<i>icd</i>	ATGGAAAGTAAAGTAGTTGTTCCGGCACA	0,2 mM de dNTPs, 2,5 mM de MgCl ₂ , 0,4 µM de cada cebador, 4 ng/µl de ADN, 1,25 U de Taq Polimerasa y 1x de <i>buffer</i> de la enzima	54	1 min a 94 °C, [1 min a 94 °C, 1 min a <i>annealing</i> correspondiente, 1 min a 72 °C] x 30, extensión 10 min a 72 °C	878	
	GGACGCAGCAGGATCTGTT					
<i>recA</i>	CGCATTGCTTTACCCTGACC		56		60	932
	TCGTGCAAATCTACGGACCGGA					
<i>adk</i>	ATTCTGCTTGGCGCTCCGGG		64		806	
	CCGTCAACTTTTCGCGTATTT					
<i>mdh</i>	AGCGCGTTCTGTTCAAATGC		911			
	CAGGTTCAAGAACTCTCTCTGT					
<i>fumC</i>	TCACAGGTCGCCAGCGCTTC		816			
	GTACGCAGCGAAAAAGATTC					
<i>gyrB</i>	TCGGCGACACGGATGACGGC		816			
	ATCAGGCCTTCACGCGCATC					
<i>purA</i>	CGCGCTGATGAAAGAGATGA	816				
	CATACGGTAAGCCACGCAGA					

4. Resistencia a antibióticos

4.1 Tamizaje primario

Para realizar el tamizaje se evaluó la sensibilidad reducida a fluoroquinolonas (FQ) en los 303 aislamientos, teniendo en cuenta el ECOFF para ciprofloxacina en *E. coli* definido por el EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing). A partir de cultivos frescos en TSA, se prepararon suspensiones bacterianas en agua destilada estéril, se ajustaron a la escala 0,5 de Mac Farland y se sembraron en placas de agar Müeller Hinton suplementadas con Ciprofloxacina (CIP) [0,125 µg/ml]. Todas las placas se incubaron a 37 °C durante 24 hs. Transcurrido el tiempo de incubación, se interpretó la ocurrencia de crecimiento en las placas como resistencia al antibiótico y la ausencia de crecimiento como sensibilidad en las concentraciones ensayadas. Como control, se utilizó la cepa *E. coli* ATCC 25922.

4.2 Antibiogramas

A aquellos aislamientos con sensibilidad reducida a CIP [0,125 µg/ml] se les realizaron estudios ampliados de susceptibilidad por el método de disco-difusión de Kirby-Bauer en agar Müller-Hinton siguiendo las normas de la CLSI 2016 (Clinical Laboratory Standard Institute). Los antibióticos utilizados fueron amoxicilina-ácido clavulánico (AMC), ampicilina (AMP), cefuroxime (CXM), ceftriaxona (CRO), ceftazidime (CAZ), cefepime (FEP), imipenem (IMP), meropenem (MEM), ácido nalidíxico (NA), ciprofloxacina (CIP), enrofloxacin (ENR), gentamicina (CN), amikacina (AK), trimetoprim-sulfametoxazol (SXT), fosfomicina (FOS) y azitromicina (AZM) (Oxoid). El control de calidad fue realizado con la cepa de *E. coli* ATCC 25922. Además, se realizó el test de sinergia de doble disco para la búsqueda de β-lactamasas de espectro extendido (BLEE) en las cepas que presentaron resistencia a cefalosporinas de tercera generación de acuerdo a la CLSI 2016.

4.3 Elementos genéticos móviles

La presencia de integrones clase 1 y clase 2 se evaluó mediante la amplificación parcial de los genes *int1* e *int2* presentes en el extremo 5' de cada clase de integrón; y los genes *qacEΔ1* y *sul1* presentes en el extremo 3' del integrón de clase 1. La secuencia de los cebadores, las mezclas de reacción y el ciclado para la amplificación de cada gen se detallan en la Tabla 4. Para corroborar la presencia de los genes evaluados, los productos de PCR se analizaron en geles de agarosa 0,8 %, teñidos con Bromuro de Etidio y se observaron bajo luz UV. Para determinar el tamaño de los amplicones se utilizó el marcador 1 kb Plus (Thermo Scientific). Estos ensayos se realizaron en la Facultad de Veterinaria de la Universidad del Centro de la Provincia de Buenos Aires, Tandil, Argentina, en el marco de una pasantía financiada por PEDECIBA en 2015.

En aquellos aislamientos en los que se detectó la presencia de *int1*, *qacEΔ1* y *sul1* se secuenció la región variable (RV) del integrón clase 1 utilizando los cebadores 5CS y 3CS (Tabla 4). La mezcla de reacción y el ciclado del PCR se detallan en la Tabla 4. Para corroborar la presencia de los genes evaluados, los productos de PCR se analizaron en geles de agarosa 0,8 %, teñidos con Bromuro de Etidio y se observaron bajo luz UV. Los productos de PCR obtenidos se secuenciaron en MacroGen (Corea) para confirmar su identidad y determinar qué arreglo de casetes de genes estaba presente en cada aislamiento. El alineamiento y los análisis de secuencias se realizaron

con el programa bioinformático BioEdit (versión 7.5.0.3) y el programa en línea Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). El estudio de la región variable del integrón clase 1 se realizó en colaboración con investigadores del Departamento de Bacteriología y Virología del Instituto de Higiene, Facultad de Medicina, UdelaR.

Tabla 4. Cebadores, mezcla de reacción y ciclado para la detección de los genes que codifican para los integrones clase 1 y 2 y la RV del integrón clase 1.

Cebadores	Secuencia 5'---3'	Tamaño (pb)	Mezcla de reacción (vol. final 25 µl)	Ciclado	Referencia
Int1-F	ATCATCGTCGTAGAGACGTCGG	892	0,2 mM de dNTPs, 2,0 mM de MgCl ₂ , 0,4 µM de cada cebador, 2 ng/µl de ADN, 1 U de Taq Polimerasa y 1x de <i>buffer</i> de la enzima.	10 min a 94 °C, [1 min a 94 °C, 1 min a 57 °C, 2 min a 70 °C] x 30, extensión 10 min a 72 °C	(Rosser y Young 1999)
Int1-R	GTCAAGGTTCTGGACCAGTTGC				(Orman <i>et al.</i> 2002)
Int2-F	GCAAATGAAGTCAACGC	700	0,2 mM de dNTPs, 2,0 mM de MgCl ₂ , 0,4 µM de cada cebador, 2 ng/µl de ADN, 1 U de Taq Polimerasa y 1x de <i>buffer</i> de la enzima.	10 min a 94 °C, [1 min a 95 °C, 30 s a 65 °C, 2 min a 70 °C] x 9, [1 min a 95 °C, 30 s a 55 °C, 2 min a 70 °C] x 14, extensión 5 min a 72 °C	(Ebner <i>et al.</i> 2004)
Int2-R	ACACGCTTGCTAACGATG				
qacEΔ1-F	GAGGGCTTTACTAAGCTTGC	200	0,2 mM de dNTPs, 2,0 mM de MgCl ₂ , 0,4 µM de cada cebador, 2 ng/µl de ADN, 1 U de Taq Polimerasa y 1x de <i>buffer</i> de la enzima.	5 min a 95 °C, [45 s a 94 °C, 45 s a 50 °C, 2 min a 72 °C] x 35 °C, extensión 7 min a 72 °C	(Bado <i>et al.</i> 2010)
qacEΔ1-R	ATACCTACAAAGCCCCACGC				
Sul1-F	ATCAGACGTCGTGGATGTCG	346	0,2 mM de dNTPs, 2,0 mM de MgCl ₂ , 0,4 µM de cada cebador, 2 ng/µl de ADN, 1 U de Taq Polimerasa y 1x de <i>buffer</i> de la enzima.		
Sul1-R	CGAAGAACCGCACAATCTCG				
5CS	GGCATCCAAGCAGCAAGC	---	0,2 mM de dNTPs, 2,0 mM de MgCl ₂ , 0,4 µM de cada cebador, 2 ng/µl de ADN, 1 U de Taq Polimerasa y 1x de <i>buffer</i> de la enzima.		
3CS	AAGCAGACTTGACCTGAT				

4.4 Mecanismos de resistencia transferibles a quinolonas y β-lactamasas

La presencia de mecanismos de resistencia transferibles a quinolonas y a β-lactamasas se evaluó por PCR a tiempo final en colaboración con investigadores del Departamento de Bacteriología y Virología del Instituto de Higiene, Facultad de Medicina, UdelaR. El protocolo y mezcla de reacción para cada corrida se describe en la Tabla 5. Para la resistencia transferible a quinolonas se estudió la presencia de los genes que codifican para las proteínas QnrA, QnrB, QnrC, QnrD, QnrS y QepA. Paralelamente se evaluó la presencia de los genes *bla_{SHV}*, *bla_{PER-2}*, *bla_{TEM}* y *bla_{CTX-M}* en los aislamientos que fueron positivos para el test de sinergia de doble disco BLEE realizado previamente.

Tabla 5. Cebadores, mezcla de reacción y ciclado para la detección de los genes *qnr*, *qep*, y *bla*.

Gen	Cebadores	Secuencia 5'--- 3'	Tamaño (pb)	Mezcla de reacción (vol. final 25 µl)	Ciclado	Referencia	
<i>qnrA</i>	QnrA-F	ATTTCTCACGCCAGGATTTG	516	0,2 mM de dNTPs, 2,0 mM de MgCl ₂ , 0,4 µM de cada cebador, 2 ng/µl de ADN, 1 U de Taq Polimerasa y 1x de <i>buffer</i> de la enzima.	5 min a 95 °C, [45 s a 94 °C, 45 s a temp. annealing (izq), 2 min a 72 °C] x 35 °C, extensión 7 min a 72 °C	(Bado <i>et al.</i> 2010)	
	QnrA-R	GATCGGCAAAGGTTAGGTCA					53 °C
<i>qnrB</i>	QnrB-F	GATCGTGAAAGCCAGAAAGG	469				52 °C
	QnrB-R	ACGACGCCTGGTAGTTGTCC					
<i>qnrC</i>	QnrC-F	GGGTTGTACATTTATTGAATC	307				50 °C
	QnrC-R	CACCTACCCATTTATTTTCA					
<i>qnrD</i>	QnrD-F	CGAGATCAATTTACGGGGAATA	580				51 °C
	QnrD-R	AACAAGCTGAAGCGCCTG					
<i>qnrS</i>	QnrS-F	ACGACATTCGTCAACCTGCAA	417				53 °C
	QnrS-R	TAAATTGGCACCTGTAGGC					
<i>qepA</i>	QepA-F	AACTGCTTGAGCCCGTAGAT	595				56 °C
	QepA-R	GTCTACGCCATGGACCTCAC					
<i>bla_{SHV}</i>	SHV-A	ATGATGAGCACCTTTAAAGTA	620				52 °C
	SHV-B	ATTTGCTCGGCCATGCTCGC					
<i>bla_{PER-2}</i>	PER 2-F	TGTGTTTTCCCGCTTCTGCTCTG	878	48 °C			
	PER 2-R	CAGCTCAAAGTATAAGCCGCTTG					
<i>bla_{TEM}</i>	OT3	ATGAGTATTCAAACCTTTCCG	900	52 °C			
	OT4	CCACTGCTTAATCAGTGAGG					
<i>bla_{CTX-M}</i>	PAN CTX-M-F	TTTGCATGTGCAGTACCAGTAA	543	59 °C			
	PAN CTX-M-R	CGATATCGTTGGTGGTGCCATA					
	CTX-M-1-F	CCCATGGTTAAAAAATCACTG	830		54 °C		
	CTX-M-AS-R	CGTAGCCGGGCCCAACGTGA					
	CTX-M gr2-F	TTAATGATGACTCAGAGCATT	875		51 °C		
	CTX-M gr2-R	GATACCTCGCTCCATTTATTGC					
	CTX-M gr3-F	ACCTGATTAACACTACAATCCCAT	514		55 °C		
	CTX-M gr3-R	ACTTTCTGCCTTCTGCTCTGGC					
	CTX-M gr4-F	GCTGGAGAAAAGCAGCGGAG	473		57 °C		
	CTX-M gr4-R	GTAAGCTGACGCAACGTCTG					
	CTX-9-M-F	ATGGTGACAAAGAGARTGCAA	841		60 °C		
	CTX-9-M-R	TTACAGCCCTTCGGCGATGAT					
	CTX-M-25-F	AGAAAAAGCGTAAGGCGGGC	862		56 °C		
CTX-M-25-R	CCGTGCGTGACAATTCTGGC						

5. Interacción bacteriana con células eucariotas en cultivo

La interacción bacteriana con cultivos de células eucariotas se evaluó en el marco de una Pasantía en el Laboratorio de Inmunoquímica y Biotecnología de la Facultad de Veterinaria en la Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires (UNCPBA), financiada por PEDECIBA y realizada en Mayo-Junio de 2015. Las líneas celulares VERO y Hep-2 empleadas pertenecen a la colección del Laboratorio de Inmunoquímica y Biotecnología de dicha Facultad.

5.1 Adhesión a células Hep-2

La capacidad de las cepas de *E. coli* de adherirse a cultivos de células eucariotas se estudió en la línea celular Hep-2, derivada de un carcinoma epidermoide (Toolan 1954).

Para la realización de este ensayo se utilizó el protocolo descrito por Etcheverría y colaboradores (2011). Brevemente, las células Hep-2 se cultivaron rutinariamente en placas estériles de 48 pocillos en medio MEM (Sigma) suplementado con 10 % (v/v) de suero fetal bovino estéril (SFB), 100 mg/l de penicilina, 200 mg/l de estreptomina y 2,2 g/l de NaHCO₃ y se incubaron a 37 °C y 5 % de CO₂ hasta obtener monocapas confluentes. Paralelamente se realizaron cultivos bacterianos de los aislamientos de *E. coli* en 5 ml de medio LB a 37 °C. Transcurridas 24 hs, la concentración de cada una de las suspensiones bacterianas se cuantificó con espectrofotómetro y se prepararon las diluciones -8, -7 y -6 en PBS estéril.

A continuación, la monocapa de células Hep-2 se lavó y se repuso el medio de cultivo sin los antibióticos adicionados previamente, y se procedió a sembrar 200 µl de la dilución -6 de cada suspensión bacteriana a cada pocillo de células Hep-2 (dilución -5 final). Todos los aislamientos se sembraron por duplicado y se incubaron durante 3 hs a 37 °C y 5 % de CO₂. Transcurrido el tiempo de incubación se extrajo todo el medio de cultivo de los pocillos y se lavaron las monocapas con PBS para eliminar las bacterias no adheridas. Las monocapas de células Hep-2 se desprendieron con 100 µl de Tripsina-EDTA y se lavaron con 450 µl de PBS (x2). Finalmente se sembraron en superficie 100 µl de las diluciones -1 y -2 de cada pocillo en placas de Petri con medio LA. El porcentaje de adhesión se calculó por recuento en placa luego de una incubación de 24 hs a 37 °C; y se expresó como el porcentaje de bacterias adheridas respecto al total: planctónicas más adheridas.

5.2 Citotoxicidad en células VERO

La línea celular VERO, derivada de células de riñón de mono verde, se utilizó para evaluar la citotoxicidad de los aislamientos de *E. coli* productores de toxinas tipo shiga, también llamadas verocitotoxinas por su efecto citotóxico en esta línea celular eucariota (Konowalchuk *et al.* 1977).

Las células VERO se cultivaron rutinariamente en placas estériles de 96 pocillos con medio MEM (Sigma), suplementado con 10 % (v/v) de SFB, 100 mg/l de penicilina, 200 mg/l de estreptomycinina y 2,2 g/l de NaHCO₃, y se incubaron a 37 °C y 5 % de CO₂ hasta obtener monocapas confluentes. Simultáneamente los aislamientos de *E. coli* se cultivaron en 5 ml de LB a 37 °C y transcurridas 18 hs se centrifugó cada uno de los cultivos bacterianos y se colectaron los sobrenadantes. Las monocapas de células VERO se lavaron con PBS estéril (x2) y se les repuso el medio pero en esta oportunidad suplementado con 5 % de SFB para conseguir que la duplicación celular fuera más lenta. A continuación, se sembraron 50 µl de cada sobrenadante en los pocillos de células eucariotas y se incubó la placa a 37 °C y 5 % de CO₂ durante 48 hs. Cada aislamiento se sembró por duplicado. Transcurrido el tiempo de incubación, las células se tiñeron con Azul de Metileno al 10 %, se fijaron con metanol y se realizó la lectura de destrucción de monocapa en cada pocillo con microscopio de luz transmitida. En el ensayo se incluyeron pocillos control negativo, que no recibieron ningún sobrenadante y pocillos a los cuales se les agregó sobrenadante de cultivos de *E. coli* O:157H:7 aislada de bovino, cuyo efecto citotóxico había sido descrito previamente descrito (Angel Villegas *et al.* 2013).

6. Producción de *biofilms*

6.1 Técnica semi-cuantitativa de tinción con Cristal Violeta

Para estudiar la capacidad de formar *biofilms* de los aislamientos de *E. coli* se evaluó la capacidad de adherirse a superficies abióticas mediante la técnica semi-cuantitativa de tinción con Cristal Violeta (CV) descrita por Pratt y Kolter (1998) y previamente desarrollada en nuestro laboratorio (Schlapp *et al.* 2011).

A partir de cultivos frescos (24 hs) de *E. coli* en medio LB se realizaron diluciones 1/10 de cada aislamiento en medio LB, en placas de microtitulación de poliestireno (por cuadruplicado), las cuales se incubaron durante 48 hs a 37 °C de forma

estática. Transcurrido el tiempo de incubación, las células no adheridas se removieron por inversión de las placas mientras que las adheridas se tiñeron con una solución 0,1 % de CV durante 15 min. El exceso de colorante se eliminó mediante lavados con PBS. Para realizar la cuantificación, el CV se solubilizó con etanol 95° puro para análisis y se midió la absorbancia a 590 nm. Como control positivo se utilizó la cepa *P. mirabilis* 2921, ampliamente caracterizada en nuestro laboratorio, la cual forma *biofilms* con esta técnica (Schlapp *et al.* 2011). Finalmente, se tomó como referencia el criterio previamente determinado por Angel Villegas y colaboradores (2013) para establecer si los aislamientos presentaban una capacidad alta ($DO_{\text{aislamiento}} > (4 \times DO_{\text{control}})$), media ($(2 \times DO_{\text{control}}) < DO_{\text{aislamiento}} \leq (4 \times DO_{\text{control}})$), débil ($(DO_{\text{control}}) < DO_{\text{aislamiento}} \leq (2 \times DO_{\text{control}})$) o nula ($DO_{\text{aislamiento}} \leq DO_{\text{control}}$) de formar *biofilms* en placas de poliestireno.

6.2 Análisis de la bioarquitectura de los *biofilms* por Microscopía Laser Confocal (MLC)

6.2.1 Cultivos bacterianos en cubreobjetos

Se sembró una colonia aislada de cada aislamiento de *E. coli* en tubos Falcon conteniendo 30 ml de medio LB y un cubreobjetos estéril en su interior. Cada aislamiento se sembró por cuadruplicado, los cuales se utilizaron para evaluar la formación de *biofilms* a los días 1 (D1), 3 (D3), 5 (D5) y 7 (D7). Todos los cultivos se incubaron a 37 °C de forma estática. Previo a su esterilización, los cubreobjetos se trataron con solución de lavado (etanol 70 %, HCl 1 %) durante 1 min para asegurar la ausencia de impurezas en su superficie.

6.2.2 Tinción con Syto 80 y obtención de imágenes con MLC

Para la tinción de los *biofilms* bacterianos generados sobre los cubreobjetos se utilizó el fluoróforo *Syto Orange-fluorescent nucleic acid stain 80*, Syto80 (Molecular Probes). Cada cubreobjeto se retiró del tubo Falcon con el medio de cultivo y se incubó durante 30 min en 100 µl de *buffer* (NH₄Cl 0,05 M y seroalbúmina bovina (BSA) 2 % en PBS, pH=7,2) conteniendo una concentración 10 µM final del fluoróforo Syto 80 (λemisión: 531 nm, λexcitación: 545 nm). Durante la incubación, los cubreobjetos se mantuvieron en cámara húmeda, protegidos de la luz. Transcurrido el tiempo de incubación los cubreobjetos se lavaron 3 veces con agua destilada y se montaron en

portaobjetos conteniendo 40 μl de medio de montaje Citifluor. Todos los preparados se sellaron y se almacenaron a 4 °C hasta su observación en el microscopio confocal.

Para la observación de las muestras e identificación de las bacterias en el cubreobjetos se utilizó el microscopio de epifluorescencia Olympus BX61 (Olympus) y el filtro dicróico N-41004 (Texas red), cuya longitud de onda de excitación es 596 nm y de emisión 620 nm. Los *biofilms* bacterianos se analizaron en el microscopio laser confocal Fluoview 300 y el *software* Fluoview 4.3 (Olympus) utilizando el objetivo de aceite de inmersión 100x. La excitación del fluoróforo presente en la muestra se realizó con el láser Helio-Neón verde 543; y para la observación de cada plano focal, la apertura numérica 3 (AN=3) y el filtro de barrera BA560-600. Se tomaron al menos 3 *Z-stacks* de cada cubreobjetos, los cuales se eligieron aleatoriamente; y la adquisición de las imágenes se realizó con un *step size* de 0,3 μm en el eje Z y 1024 x 1024 píxeles en el plano XY. El tamaño del pixel fue de 0,07 μm . Ambos microscopios utilizados en este ensayo pertenecen a la Plataforma de microscopía confocal del IIBCE.

6.2.3 Análisis de imágenes

La deconvolución del *stack* de imágenes se llevó a cabo con el *software* Huygens Professional (www.svi.nl). De esta manera se eliminó el ruido y el *background* y se corrigieron las posibles distorsiones ocasionadas por la emisión de fluorescencia fuera de foco en el eje Z. A continuación, las imágenes deconvolucionadas se segmentaron en forma manual empleando la plataforma IDL 7.1 (Interactive Data Language, ITT, Co, USA) y el *software* Sciansoft (www.scian.cl) de acuerdo a lo descrito por Schlapp y colaboradores (Schlapp *et al.* 2011). Para realizar la segmentación se utilizó la técnica de *thresholding* y los filtros *fill remove*, que rellena hoyos en objetos y permite remover objetos de pequeño tamaño, mediana, que suaviza las imágenes y los contornos y *deviation kernel*, que permite resaltar los bordes.

Una vez reconstruidas las imágenes se calcularon los parámetros de todas las imágenes obtenidas. Los descriptores evaluados fueron número de bacterias y volumen bacteriano en cada campo.

7. Expresión de CS31A

7.1 Producción de ClpG recombinante

7.1.1 Cepas bacterianas y plásmido de expresión

Para la generación de la proteína recombinante se seleccionó el aislamiento 3.4A. Dicho aislamiento fue obtenido de un animal con síntomas graves de DNT en el Departamento de Colonia en 2012 y fue el primer aislamiento positivo para *clpG* de la colección de *E. coli*. Ninguno de los otros genes evaluados por PCR fueron encontrados en este aislamiento.

La cepa *E. coli* XL-1 Blue fue utilizada para la transformación y estabilización del plásmido de expresión (Bullock *et al.* 1987), mientras que para la expresión de ClpG se utilizó la cepa *E. coli* BL21 (λ DE3) (Studier y Moffatt 1986). Esta última es lisogénica para el fago DE3, el cual presenta el gen que codifica para la ARN polimerasa T7 bajo el promotor Lac UV5 (inducible por isopropil- β -D-tiogalactopiranosas (IPTG) en el cultivo bacteriano). Por otro lado, para la expresión de la proteína se utilizó el plásmido pET-21a(+) (Studier y Moffatt 1986), el cual es resistente a Ampicilina y presenta el promotor T7.

El cultivo de estas cepas se realizó en medio LB a 37 °C durante 24 hs. En los casos que se requirió seleccionar colonias de *E. coli* que presentaran el plásmido pET, se adicionó al medio Ampicilina a una concentración final de 100 μ g/ml.

7.1.2 Amplificación del gen *clpG* por PCR

Para la amplificación del gen *clpG* se extrajo el ADN de la cepa *E. coli* 3.4A con el kit comercial *GenElute Bacterial Genomic DNA kit* (Sigma) de acuerdo a las instrucciones del proveedor y se cuantificó su concentración con Nanodrop (Thermo Scientific).

Los cebadores se diseñaron a partir de la secuencia publicada del gen *clpG* completo (número de acceso en Pubmed: M55389.1) y se incorporaron en sus secuencias los sitios de restricción para las enzimas *NdeI* y *HindIII* (New England, BioLabs) (Tabla 6). Al cebador ClpGr-F se le incorporó un sitio de corte de la enzima *NdeI*, de forma que la enzima cortara la secuencia dejando al principio los nucleótidos correspondientes al codón inicio del gen. Por otro lado, el cebador ClpGr-R se le

incorporó una cola de 6 residuos de histidina luego del último codón codificante, seguida por el sitio de corte de la enzima *HindIII* y un codón *stop*. Los detalles del ciclado y mezcla de reacción del PCR se detallan en la Tabla 6.

Tabla 6. Cebadores, mezcla de reacción y ciclado para la amplificación del gen completo *clpG* que codifica para la adhesina CS31A de *E. coli*

Cebadores	Secuencia cebadores 5'--- 3' (*)	Posición	Tamaño (pb)	Mezcla de reacción (vol. final 25 µl)	Ciclado
ClpGr-F	GGAATTTATCATATGAAAAAGACTCTGA TTGC	83-102	833	0,1 mM de dNTPs, 1,5 mM de MgCl ₂ , 0,32 µM de cada cebador, 2 ng/µl de ADN, 1 U de Taq Polimerasa y 1x de <i>buffer</i> de la enzima.	3 min a 94 °C, [1 min a 94 °C, 1 min a 48 °C, 1 min a 72 °C] x 30, extensión 5 min a 72 °C
ClpGr-R	CGCCCTTAAGCTTAATGGTGATGGTGA TGGTGGTAAAGGTTGCTTCAATAGTC	892-916			

* Se señalan subrayados los sitios de corte de las enzimas de restricción y en negrita la cola de histidina.

7.1.3 Purificación de ADN plasmídico

Para la purificación plasmídica se utilizó el kit comercial AxyPrep Plasmid Miniprep Kit: Spin Protocol (Axygen). Se inocularon 10 ml de LB/Amp [100µg/ml] con una colonia aislada de la cepa *E. coli* BL21 pET21a(+) ó *E. coli* XL-1 Blue-ClpG y se incubó toda la noche a 37 °C. Transcurrido el tiempo de incubación se colectaron 4 ml de cada cultivo, los cuales se utilizaron para la purificación de los plásmidos, de acuerdo a lo indicado en el manual del kit.

La presencia de los plásmidos purificados se corroboró en un gel de agarosa 0,8 % teñido con GelRed (Biotum) y se observó bajo luz UV. El ADN plasmídico se almacenó a -20 °C hasta su uso.

7.1.4 Digestión enzimática del producto de PCR y del plásmido de expresión

La digestión enzimática del gen que codifica la proteína ClpG y del plásmido pET21a(+) se realizó con las enzimas *NdeI* y *HindIII* (New England, Biolabs). El tiempo de reacción fue de 1 h a 37 °C. La mezcla de reacción para la digestión del gen consistió en 25 µl de ADN, 0,5 µl de *HindIII* y 1,0 µl de *NdeI*, 1x del *buffer* (provisto con las enzimas) en un volumen final de 50 µl. Por otro lado, la mezcla de reacción para la

digestión del plásmido consistió en 22 μ l de ADN, 0,5 μ l de HindIII y 1,0 μ l de NdeI, 1x del *buffer* (provisto con las enzimas) en un volumen final de 50 μ l. Paralelamente a la digestión doble del plásmido se realizaron 2 digestiones simples del mismo plásmido con cada enzima por separado. En estos casos, el volumen final de la mezcla de reacción fue 25 μ l. Transcurrido el tiempo de incubación se inactivaron las enzimas a 80 °C durante 20 min.

7.1.5 Ligación

La ligación del gen que codifica para la proteína ClpG y el plásmido pET21a(+) se realizó con la enzima ADN ligasa T4 (New England, Biolabs). Ambos productos, previamente digeridos con las enzimas de restricción se incluyeron en una mezcla de reacción y se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente (TA). La mezcla de reacción consistió en 10 μ l de plásmido doble digerido, 7 μ l del gen digerido, 1 μ l de la ADN ligasa T4 y 2 μ l de *buffer* (provisto con la ADN ligasa). Además, se incorporó un control de re-ligación del plásmido. En ambos casos, el volumen final de la mezcla de reacción fue 20 μ l. Transcurrido el tiempo de incubación se inactivó la enzima colocando las mezclas de reacción a 65 °C durante 10 min.

7.1.6 Preparación de células competentes

La generación de células competentes de *E. coli* XL-1 Blue y *E. coli* BL21 (λ DE3) se realizó de acuerdo al método químico con cloruro de calcio (CaCl_2). En primer lugar se inocularon 2 caldos LB, cada uno con una colonia aislada de *E. coli* XL-1 Blue ó *E. coli* BL21 (λ DE3), a 37 °C con agitación durante aproximadamente 3 hs. Cuando la DO_{600} alcanzó valores de 0,4 se centrifugaron los cultivos a 4.000 rpm y 4 °C, durante 10 min, y se descartaron los sobrenadantes. Ambos sedimentos se resuspendieron en 25 ml de CaCl_2 50 mM, estéril y frío y se centrifugaron a 4.000 rpm durante 8 min a 4 °C. Posteriormente las células se resuspendieron suavemente en 20 ml de CaCl_2 frío y se incubaron en hielo durante 30 min. Transcurrido el tiempo de incubación, la suspensión se centrifugó en las mismas condiciones anteriores y las células se resuspendieron suavemente en 2 ml de CaCl_2 estéril y frío. Finalmente se agregó glicerol estéril, 10 % (v/v) final a las células competentes y se almacenaron en alícuotas a -80 °C hasta su uso.

7.1.7 Transformación

Para la transformación de *E. coli* XL-1 Blue con pET21a(+)-*clpG* se mezclaron en hielo 200 μ l de células con 8 μ l de plásmido y se realizó un *shock* térmico a 42 °C durante 80 segundos. Inmediatamente después se agregó 1 ml de caldo LB y se incubó durante 1 h y 30 min a 37 °C con agitación lenta. Transcurrido el tiempo de incubación, las células se plaquearon en agar LB/Amp [100 μ g/ml] y en agar LB como control y se incubaron a 37 °C durante 24 hs. Previo a la transformación, una alícuota de las células competentes se plaqueó en medio agar LB para corroborar la viabilidad de las células luego del proceso de competencia con CaCl₂. Asimismo, se transformó con el plásmido re-ligado. Las colonias correctamente transformadas (aquellas que crecieron en las placas de agar LB/Amp) se almacenaron a -80 °C en caldo LB/Amp [100 μ g/ml] y glicerol 20 % (v/v) final.

Posteriormente se seleccionó uno de los clones de *E. coli* XL-1 Blue con el vector de expresión, se extrajo el plásmido de acuerdo a lo descrito en 7.1.3 y se transformó la cepa de expresión *E. coli* BL21 (λ DE3) siguiente el protocolo detallado más arriba. Nuevamente, las colonias correctamente transformadas (aquellas que crecieron en las placas de agar LB/Amp) se almacenaron a -80 °C en caldo LB/Amp [100 μ g/ml] y glicerol 20 % (v/v) final.

7.2 Sobreexpresión de ClpG recombinante en *E. coli*

Se inocularon 200 ml de caldo LB/Amp [100 μ g/ml] con una colonia aislada de *E. coli* BL21(λ DE3)(pET-ClpG) y el medio se incubó a 37 °C con agitación vigorosa. Una vez que el cultivo alcanzó una DO₆₀₀ entre 0,4 y 0,8 nanómetros (nm) se indujo la expresión de la proteína agregando IPTG a una concentración final de 1 mM. El cultivo se incubó con agitación vigorosa durante 3 hs a 37 °C y se centrifugó a 10.000 rpm y 4 °C durante 15 min. Finalmente, el sedimento obtenido se almacenó a -20 °C para la posterior purificación de la proteína ClpG.

La expresión de la proteína recombinante se controló tomando muestras del cultivo antes y después del agregado de IPTG. Dichas alícuotas de cultivo se centrifugaron a 10.000 rpm durante 5 min y los sedimentos se resuspendieron en *buffer* de muestra 2x. Finalmente, las muestras se analizaron por SDS-PAGE al 15 %.

Previo a la purificación de ClpG se determinó si la proteína se producía de forma soluble o insoluble. Para ello, una alícuota del sedimento final se resuspendió en 5 ml de *buffer* de lisis (NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 300 mM, Imidazol 10 mM, pH=8), se agregó Lizosima 1 mg/ml final y se incubó en hielo durante 30 min. A continuación, la suspensión obtenida se sonicó de forma intermitente a 200-300 W durante 5 min (x6) en hielo y el lisado se centrifugó a 10.000 rpm por 30 min a 4 °C. Se colectó el sobrenadante (Extracto A) correspondiente a la proteína soluble y el sedimento se resuspendió en 5ml de *buffer* de lisis (Extracto B), lo correspondiente a la proteína insoluble. Una alícuota de cada extracto se analizó por SDS-PAGE al 15 %.

7.3 Purificación de ClpG recombinante

La purificación de ClpG se realizó de acuerdo al protocolo de purificación descrito por Qiagen, en condiciones desnaturalizantes.

Para la extracción de cuerpos de inclusión (CI), las células previamente inducidas con IPTG se resuspendieron en 40 ml *buffer* (Tris 50 mM, NaCl 0,5 M, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1 mM y lizosima (1mg/ml) y se incubaron en hielo durante 30 min. A continuación se agregó DNAsa (1mg/ml) y se incubó nuevamente durante 30 min en hielo. Para completar el lisado se sonicó de forma intermitente a 200-300 W durante 5 min (x6) en hielo. Cuando se obtuvo un lisado claro, se agregó Tritón x100 al 2 % final y se incubó 30 min en hielo.

Los cuerpos de inclusión presentes en el sedimento se obtuvieron por medio de centrifugación a 15.000 rpm a 4 °C, durante 30 min. Posteriormente se lavaron en 3 sucesivas centrifugaciones en 40 ml de *buffer* (Tris 50 mM, NaCl 0,5 M), centrifugando a 15.000 rpm durante 15 min a 4 °C. Finalmente los cuerpos de inclusión se resuspendieron en 10 ml de *buffer* A (Urea 8 M, Tris 10 mM, NaH_2PO_4 0,1 M, pH=8). El lisado obtenido se incubó durante 1 h a TA y luego se centrifugó a 10.000 rpm y 4 °C durante 15 min. Al sobrenadante obtenido se le agregaron 5 ml de resina equilibrada Ni-NTA (Qiagen) al 50 % y la mezcla de resina y lisado se incubó 45 min a TA, con agitación. Una vez que la columna se dejó en condiciones estáticas la resina decantó y se lavó con *buffer* A, con un flujo de salida de 10-15 ml/h aproximadamente, hasta que la absorbancia a 280 nm fue menor a 0,01. Luego, la columna se lavó con *buffer* C (Urea 8 M, Tris 10 mM, NaH_2PO_4 0,1 M, pH=6,3) y nuevamente se controló que la Abs_{280} fuera menor a 0,01. Posteriormente, la proteína unida a Niquel fue eluída de la

columna agregando *buffer* C e Imidazol a una concentración final de 500 mM. Las fracciones se recogieron en varios tubos, de los cuales el primero contuvo 15 ml de eluído y los siguientes 5 ml cada uno. Finalmente la presencia de la proteína en cada fracción se controló por SDS-PAGE al 15 %.

Aquellas fracciones en las cuales se encontró la proteína se dializaron contra agua destilada a 4 °C por 72 hs utilizando una membrana de diálisis que retiene proteínas cuyo peso molecular (PM) es mayor a 12 kDa (Sigma). La proteína dializada se almacenó en alícuotas a -20 °C hasta su uso.

7.4 Visualización de ClpG recombinante (SDS-PAGE)

El análisis de las proteínas se realizó por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) de acuerdo al protocolo descrito por Laemmli (1970). Para la preparación de los geles se usó una relación de acrilamida/bisacrilamida de 29:1 respectivamente. El gel concentrador y el gel separador se prepararon a concentraciones finales de acrilamida de 5 y 15 % respectivamente. La solución tampón utilizada para la electroforesis fue Tris-glicina (Tris 0,3 %, glicina 1,9 %, SDS 1 %). La corrida electroforética se realizó en una cuba Mini Protean II de Bio-Rad a 100 V hasta la llegada del frente de corrida al gel separador y luego se continuó a 120 V.

Antes de comenzar la corrida electroforética, las proteínas se suspendieron en *buffer* de muestra para electroforesis en geles de acrilamida (Tris-HCl 125 mM, glicerol 20 %, SDS 4 %, β -mercaptoetanol 10 %, azul de bromofenol 0,01 % y pH=6,5) al doble de su concentración inicial (2x) y se sometieron a 100 °C durante 5 minutos. Para visualizar las bandas proteicas los geles se tiñeron con azul brillante de Coomassie (0,25 g de azul brillante de Coomassie en 90 ml de etanol absoluto al 50 % en agua destilada y 10 ml de ácido acético glacial) y se decoloraron con solución decolorante (etanol 25 %, ácido acético 8 %). Para la estimación del peso molecular (PM) de la proteína se empleó el marcador de peso molecular SeeBlue® Plus 2 Prestained Standard (Life Technologies).

7.5 Cuantificación de ClpG recombinante

La cuantificación de la proteína recombinante se realizó con el método de Bradford, utilizando el kit comercial Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad) en placas de microtitulación. Se prepararon 4 diluciones de la proteína estándar BSA en agua destilada ultrapura (0,15 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,35 mg/ml, 0,45 mg/ml) en un volumen final de 10 μ l, de forma de estar en el rango lineal de la misma. Asimismo, se prepararon 2 diluciones de la proteína recombinante ClpG (1/2, 1/4) en un volumen final de 10 μ l de agua ultrapura y se sembró también una alícuota sin diluir. Cada dilución se sembró por triplicado. El volumen de siembra fue de 10 μ l de muestra (BSA ó ClpG) y se agregó 200 μ l de reactivo *Dye Reagent Concentrate* (provisto por el fabricante del kit) a cada pocillo. Transcurridos 5 min se midió absorbancia a 595 nm. Con los valores de absorbancia de la proteína BSA se realizó una curva estándar, a partir de la cual se cuantificó la proteína ClpG recombinante purificada.

7.6 Producción de anticuerpos policlonales anti-ClpG en ratón

Los anticuerpos policlonales anti-ClpG se generaron de acuerdo al protocolo desarrollado previamente en nuestro departamento por Pellegrino y colaboradores (2003).

Para la realización de este ensayo se utilizaron 8 ratones CD-1 de aproximadamente 8 semanas de edad. Los animales, pertenecientes a la Colonia de ratones CD-1 del Departamento de Microbiología, se alimentaron con ración comercial y agua *ad libitum* en las instalaciones del Bioterio del IIBCE durante todo el ensayo.

El protocolo de inmunización subcutánea incluyó la administración de 5 dosis de 30 μ g de proteína/animal los días 0 (D0), 3 (D3), 10 (D10), 17 (D17) y 24 (D24). La primera inmunización se complementó con adyuvante completo de Freund (Sigma) a una relación 1:1 con la proteína ClpG mientras que las restantes dosis se complementaron con adyuvante incompleto de Freund (Sigma), también a una relación 1:1. El volumen final de cada dosis fue de 300 μ l por animal.

Transcurridos 7 días luego de la última dosis (D31), los animales se sacrificaron por dislocación cervical y se extrajo su sangre. El suero de cada animal conteniendo los anticuerpos anti-ClpG se obtuvo luego de almacenar la sangre durante 24 hs a 4 °C y centrifugar la misma a 2.500 rpm durante 5 min. Cada suero se almacenó a -20 °C hasta su uso.

7.7 Confirmación de la identidad de la proteína recombinante

7.7.1 Identificación mediante secuenciación

La identificación del gen que codifica la proteína recombinante se evaluó mediante secuenciación. Para la obtención del plásmido de expresión que contiene la proteína ClpG, se inocularon 100 ml de medio LB/Amp [100 µg/ml] con una colonia aislada de *E. coli* BL21(λDE3)(pET-ClpG) y el medio se incubó a 37 °C durante 24 hs. Transcurrido el tiempo de incubación se purificó el plásmido pET-ClpG con el kit comercial ZR Plasmid Miniprep (Zymo Research), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Para la amplificación del fragmento conteniendo el sitio de múltiple clonado del plásmido pET-ClpG se utilizaron los cebadores (descritos en el manual del pET-21a(+)) (Novagen), mezcla de reacción y ciclado que se detallan en la Tabla 7. La correcta amplificación del fragmento de ADN se corroboró corriendo una alícuota del producto de PCR en un gel de agarosa 0,8 %, teñido con GelRed (Biotum) y se observó bajo luz UV.

Tabla 7. Cebadores, mezcla de reacción y ciclado para la amplificación del sitio de múltiple clonado del plásmido pET-ClpG, que contiene el gen que codifica para la proteína ClpG.

Cebadores	Secuencia 5'---3'	Posición	Tamaño (pb)	Mezcla de reacción (vol. final 25 µl)	Ciclado
pET21a-F	TAATACGACTCACTATAG	311-329	1093	0,1 mM de dNTPs, 1,5 mM de MgCl ₂ , 0,32 µM de cada cebador, 2 ng/µl de ADN, 1 U de Taq Polimerasa y 1x de <i>buffer</i> de la enzima.	3 min a 94 °C, [1 min a 94 °C, 1 min a 50 °C, 1 min a 72 °C] x 30, extensión 5 min a 72 °C
pET21a-R	GCTAGTTATTGCTCAGCG	69-87			

La secuenciación del fragmento de PCR amplificado se realizó en el servicio de brindado por Macrogen (Corea). El alineamiento y los análisis de las secuencias obtenidas se realizaron con el programa bioinformático BioEdit (versión 7.5.0.3) y el programa en línea BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

7.7.2 Identificación mediante análisis proteómico: MALDI- TOF

Para identificar la proteína purificada, se analizó una de las alícuotas por mapeo peptídico (MALDI-TOF). Para ello se corrió una alícuota de la proteína recombinante ClpG en un SDS-PAGE al 15 % y luego de la corrida electroforética se escindió la banda

del gel. Dicha banda fue remitida al Laboratorio de Bioquímica y Proteómica Analítica del Instituto Pasteur de Montevideo para su análisis.

7.8 Evaluación de la expresión de CS31A en los aislamientos de *E. coli*

7.8.1 Extracción de proteínas totales de *E. coli*

Para evaluar la expresión de la adhesina CS31A se cultivaron 8 aislamientos de *E. coli* (8.1, 48.1, 51.2, 59.1, 64.2, 14.3, 52.3 y 74.1) en paralelo en placas de TSA. Transcurridas 24 hs de incubación se prepararon suspensiones de cada cultivo en 1 ml de PBS y se centrifugaron a 10.000 rpm durante 5 min. El sedimento conteniendo las proteínas totales se resuspendió en *buffer* de muestras 2x y se calentó a 95 °C durante 10 min.

7.8.2 Determinación de la expresión de ClpG en *E. coli*

La expresión de la proteína ClpG se evaluó mediante la técnica de *Western blot*. Brevemente, se separaron por electroforesis alícuotas de cada uno de los extractos de proteínas totales de los aislamientos de *E. coli* seleccionados en un SDS-PAGE al 15 %. Se incluyó además una alícuota de la proteína ClpG-recombinante purificada.

Luego de realizada la corrida electroforética, se transfirieron las proteínas del gel a una membrana de nitrocelulosa de 0,45 µm de diámetro de poro (Bio-Rad). La transferencia se realizó en una cuba de electrotransferencia Mini Protean II de Bio-Rad y se llevó a cabo a 100 V durante 1 h. Para bloquear los sitios de unión inespecíficos se lavó la membrana con agua destilada y se incubó durante 1 h a TA en solución TBS-Tween (Tris-HCl 20 mM, pH=7,50, NaCl 200 mM, Tween 20 al 0.5 %)-leche en polvo descremada al 3 %. A continuación, la membrana se incubó con 10 ml de sueros de ratón anti-ClpG diluidos 1:100 en TBS-Tween-leche descremada 1 %, durante 2 hs a TA. Posteriormente se agregó el conjugado anti-IgG de ratón, acoplado a la enzima fosfatasa alcalina (Sigma) diluido 1:15.000 en TBS-Tween-leche en polvo descremada 1 % y se incubó durante 45 min a 37 °C en cámara húmeda. El desarrollo de color se observó luego del agregado de la solución tampón (Tris 100 mM, NaCl 100 mM, MgCl₂ 50 mM, pH=9,5) junto con el sustrato cromogénico para la enzima (15 mg/ml de BCIP y 30 mg/ml NBT). La membrana así tratada se incubó con agitación hasta que se observaron las bandas correspondientes a las proteínas transferidas. La reacción se

detuvo sumergiendo la membrana en una solución de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) al 0,05 % en agua destilada.

8. Análisis Estadísticos

Con el fin de evaluar la asociación entre la presencia de los genes de virulencia ensayados y el estado de los animales se utilizó el Modelo Linear Generalizado (GLM), con distribución Binomial, función logit. Para realizar estos análisis se utilizó el programa libre Past 3.11.

El Test de Chi-Cuadrado, se utilizó para analizar las asociaciones entre los genes de virulencia. Se consideró significativo un p -valor $< 0,05$.

Para evaluar la diversidad genética de los aislamientos en cada departamento se utilizó el índice de Diversidad de Shannon (H') (Byappanahalli *et al.* 2007). El índice se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$H' = - \sum_{i=1}^s p_i \cdot \ln p_i$$

S es el número de variantes genéticas únicas y p_i es el cociente entre el número de aislamientos compartiendo el mismo genotipo (i) y el total de aislamientos.

CAPÍTULO 1

Caracterización fenotípica y molecular de la
colección de aislamientos de *E. coli*

Introducción

Los patotipos ETEC, EPEC, EHEC y STEC son responsables de causar diarrea en diferentes especies animales; y junto con NTEC y DAEC forman el grupo denominado *E. coli* diarreogénicas (Mainil 2013). ETEC ha sido reportado en varias especies de mamíferos domésticos (Nagy y Fekete 1999) y es considerado el patotipo por excelencia como agente primario de diarrea en la primera semana de vida del ternero (Nguyen *et al.* 2011). Por otro lado, los patotipos EPEC y STEC pueden causar diarrea en ruminantes, en especial en terneros jóvenes, aunque también se los asocia a animales sanos (Mainil y Fairbrother 2014). Asimismo, EPEC, EHEC y STEC constituyen patotipos con el potencial de ser patógenos para el humano (Dean-Nystrom *et al.* 1998; Menge *et al.* 1999). Respecto a este último, es actualmente aceptado que los terneros son considerados el principal reservorio de STEC (Caprioli *et al.* 2005), especialmente del serogrupo O157 (Gyles 2007; Persad y LeJeune 2015). Por ejemplo, en EEUU las cepas O157 positivas se encuentran en casi todos los establecimientos ganaderos, con los bovinos excretándolas intermitentemente (Hancock *et al.* 2001). Además, como se expuso anteriormente, la relevancia de STEC y EHEC radica en que además de afectar a los bovinos, son patógenos zoonóticos.

Para el correcto diagnóstico de la DNT es determinante corroborar la presencia de los agentes en las heces, y en particular, en infecciones causadas por *E. coli* identificar los factores de virulencia de los aislamientos. Cada patotipo se caracteriza por la presencia de distintos factores de virulencia, los cuales son los que permiten a la bacteria transitar las distintas etapas de la infección, desde la adhesión y colonización hasta la infección (Mainil 2013). La identificación de los patotipos también es importante para desarrollar estrategias adecuadas de tratamiento y prevención.

Entre las medidas para la prevención de la DNT, la vacunación de hembras gestantes se basa en la transmisión de anticuerpos a los neonatos a través del calostro (Nagy y Fekete 2005). En general, estas vacunas contienen bacterias inactivadas con fimbrias o fimbrias purificadas, con la presencia o no de toxoide LT. Para el caso de infecciones por ETEC, las vacunas comerciales actuales para bovinos gestantes presentan bacterina de *E. coli* F5+ o fimbria F5 purificada, entre otros componentes (Cox *et al.* 2014). De esta manera, la transmisión de anticuerpos específicos de ciertas cepas de *E. coli* impediría la etapa inicial de adhesión al epitelio gastrointestinal. Si bien esta estrategia induce una alta producción de anticuerpos específicos contra los principales agentes virales y bacterianos, no se puede perder de vista que pueden

existir diferencias entre los patógenos circulantes y los presentes en las composiciones vacunales (Nagy y Fekete 2005). Es así que se destaca la necesidad de identificar correctamente los agentes etiológicos en cada región geográfica.

El objetivo de este capítulo consistió en caracterizar una colección de aislamientos de *E. coli* provenientes de heces de terneros afectados por DNT y animales sanos y determinar la presencia y distribución de genes de virulencia en la colección.

Resultados

Generación de la colección de aislamientos de *E. coli*

En el transcurso del período comprendido entre 2012-2014 se colectaron muestras de heces y necropsias de terneros provenientes de establecimientos de los departamentos de Colonia, Florida, San José, Tacuarembó, Soriano, Canelones, Paysandú y Artigas (Fig. 1). Colonia, San José y Canelones fueron los departamentos más representados en los análisis, observación que coincide con el hecho de que son departamentos de fuerte producción ganadera principalmente lechería, rubro en el cual la DNT tiene una elevada incidencia (Tabla 8). Cabe resaltar además que los establecimientos vecinos 4 y 5 del Depto. de Colonia, 14 y 15 del Depto. de Canelones y el establecimiento 17 en Artigas presentaban animales afectados con DNT al momento de la toma de muestras, con un alto número de animales muertos. En particular, los establecimientos 14 y 15 fueron muestreados el mismo día.

Respecto al número de animales, entre 2012 y 2013 se colectaron muestras de heces de 87 terneros y 2 muestras de necropsia (hígado e intestino) de 1 animal muerto por DNT. Además, en 2014 se recibieron heces de 2 animales de 6 meses de edad del Departamento de Artigas (Tabla 8). Si bien estos animales superaban el límite de edad establecido para la detección de diarrea neonatal, dada la gravedad de la diarrea observada en el establecimiento y el hecho de que técnicamente son considerados terneros hasta los 6 meses, fueron incluidos en el trabajo. Por lo tanto, se muestrearon 88 animales en total. El 82 % de éstos ($n= 72$), presentaba algún síntoma de diarrea, mientras que el 18 % restante ($n= 16$) estaban sanos o no presentaban síntomas al momento de la toma (Tabla 8).

Respecto a la sintomatología de los animales de los cuales se obtuvieron los aislamientos, en la mayoría de los establecimientos (88 % de los establecimientos) se muestrearon exclusivamente animales enfermos, en 2 establecimientos se muestrearon animales con síntomas y animales sin sintomatología de DNT y en un establecimiento en Canelones se muestrearon sólo animales sanos (no había enfermos al momento de la colecta de heces) (Tabla 8).



Figura 1. Mapa Político de Uruguay con los departamentos muestreados marcados en verde.

Tabla 8. Establecimientos muestreados, nº de animales muestreados, nº de animales con colonias Lac+ y nº de aislamientos luego de la identificación bioquímica y molecular.

(N) necropsia, (n/c) no corresponde.

Departamento	Establecimiento	Animales muestreados		Animales c/colonias Lac+		Aislamiento Positivos Identificación BQ y Molecular	
		Enfermos	Sanos	Enfermos	Sanos	Enfermos	Sanos
Colonia	1	5	n/c	5	n/c	22	n/c
	2	10	n/c	1	n/c	3	n/c
	3	7	n/c	7	n/c	32	n/c
	4	2	n/c	2	n/c	10	n/c
	5 (N)	1	n/c	1	n/c	2	n/c
Florida	6	4	n/c	4	n/c	16	n/c
San José	7	5	6	4	6	20	22
	8	7	n/c	3	n/c	15	n/c
	9	2	n/c	2	n/c	6	n/c
Tacuarembó	10	7	n/c	7	n/c	35	n/c
Soriano	11	8	n/c	8	n/c	40	n/c
	12	1	n/c	1	n/c	3	n/c
Canelones	13	n/c	5	n/c	5	n/c	26
	14	4	n/c	4	n/c	12	n/c
	15	4	n/c	4	n/c	11	n/c
Paysandú	16	3	5	3	5	9	13
Artigas	17	2	n/c	2	n/c	6	n/c
Sub-Total		72	16	58	16	242	61
Total		88		74		303	

Luego de la siembra de heces en placas de medio agar Mac Conkey, un total de 74 animales presentaron colonias Lac+. A partir de estos cultivos frescos se seleccionaron hasta 5 colonias Lac+ de cada una de las muestras, las cuales se

repicaron nuevamente en medio Mac Conkey para corroborar el fenotipo Lac+. Luego de la segunda incubación se obtuvo un total de 305 colonias sospechosas de *E. coli*. Estos aislamientos se repicaron en medio TSA para su identificación bioquímica y se almacenaron a -20 °C y -80 °C en medio TSB adicionado con 15 % de glicerol estéril.

Una vez realizadas las pruebas bioquímicas, 303 aislamientos exhibieron el siguiente perfil bioquímico: VP negativo, indol positivo, catalasa positiva, oxidasa negativa, crecimiento a 45 °C con producción de gas, citrato negativo y fermentación de la glucosa. En todos los casos se trató de bastones Gram negativos (Tabla 8). Por otro lado, 2 aislamientos presentaron un perfil bioquímico concordante con *Klebsiella* spp.: VP positivo, indol negativo, catalasa positiva, oxidasa negativa, crecimiento a 45 °C con producción de gas, citrato positivo y fermentación de la glucosa.

La identidad molecular de la colección se determinó mediante la secuenciación del gen que codifica al ARNr 16S por PCR. Todos los productos de amplificación se analizaron en geles de agarosa teñidos con GelRed y presentaron el tamaño esperado (1400pb aproximadamente). Luego fueron secuenciados y las secuencias obtenidas se analizaron con las herramientas bioinformáticas BLASTn y RDP. Todas las muestras excepto 2 presentaron homología con *E. coli*, con un porcentaje de identidad del 99 % respecto a las secuencias publicadas. Por otro lado, los aislamientos 59.2 y 59.3, que habían presentado un perfil bioquímico concordante con *Klebsiella* presentaron un porcentaje de identidad del 99 % concordante con *Klebsiella* spp.

Asimismo, las secuencias del ARNr 16S de *E. coli* obtenidas se utilizaron para estudiar la filogenia de la colección (Anexo II). Para la construcción de los árboles se incluyeron las secuencias de los aislamientos de *Klebsiella* spp. 59.2 y 59.3. De acuerdo a la filogenia propuesta por el árbol obtenido con el método de máxima verosimilitud y el modelo de Kimura con 2 parámetros los aislamientos están filogenéticamente relacionados entre sí (Anexo II).

Estos análisis corroboraron los resultados previos alcanzados con las pruebas bioquímicas, quedando confirmada la colección de 303 aislamientos de *E. coli*. El 79,9 % de estos aislamientos (n=242) provinieron de animales con síntomas de DNT y el 20,1 % (n=61) provinieron de animales sin síntomas al momento de la colecta.

Análisis de genes asociados a virulencia de *E. coli*

Se pusieron a punto 8 PCR simples y 1 PCR múltiple para evaluar la presencia de genes de virulencia de *E. coli*. En todos los casos se utilizaron controles positivos provistos por el Departamento de Desarrollo Biotecnológico de VIRBAC-SE, por el Departamento de Bacteriología y Virología del Instituto de Higiene o incluidos en el Kit comercial DEC-Primer Mix (SSI Diagnostica). Para cada PCR se corroboró la identidad de los productos de amplificación que presentaban el tamaño esperado mediante la secuenciación de uno de ellos (Fig. 2). En todos los casos se obtuvo un porcentaje de identidad superior al 98 % entre nuestros productos de amplificación y las secuencias publicadas de los genes de virulencia buscados en cada PCR.

El 73 % de los animales (n=54) presentó al menos uno de los genes de virulencia ensayados mientras que el 27 % (n=20) no dio resultado positivo en ningún caso (Fig. 3). Entre los animales positivos se encontraron animales con un sólo gen de virulencia (n=17), 2 genes (n=22), 3 genes (n=13), 4 genes (n=1) y 5 genes de virulencia (n=1) diferentes en simultáneo. Además se observó que aislamientos de un mismo animal presentaban distintos perfiles de genes de virulencia.

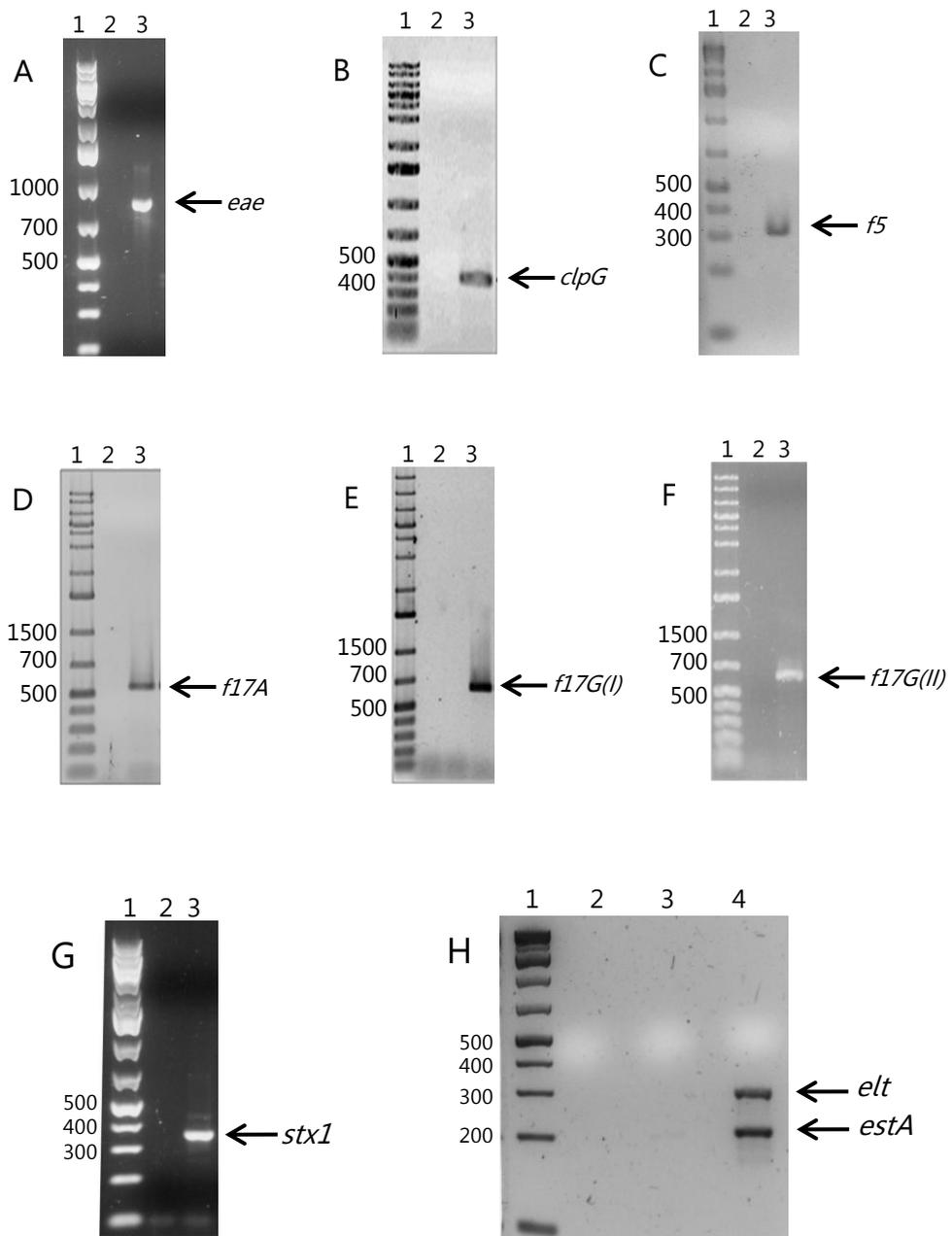


Figura 2. Productos de amplificación correspondientes a genes de virulencia de *E. coli* en gels de agarosa teñidos con GelRed. A-H: Productos de amplificación parcial de los genes *eae*, *clpG*, *f5*, *f17A*, *f17G(I)*, *f17G(II)*, *stx1*, *elt* y *estA* respectivamente. Carril 1 de cada gel: 1 kb Plus (Thermo Scientific). Las flechas señalan el producto del tamaño esperado.

Respecto al estado del animal y la presencia de genes, el 70,7 % (n=41) de los animales que estaban enfermos presentaron al menos uno de los genes de virulencia estudiados, mientras que el 29,3 % restante (n=17) estaban enfermos pero no presentaron ningún gen de virulencia (Figura 3). Todos los genes analizados se encontraron presentes tanto en animales sanos como en animales enfermos, a excepción de *f5* y *f17G(I)*, los cuales sólo se encontraron en animales que presentaban síntomas de DNT.

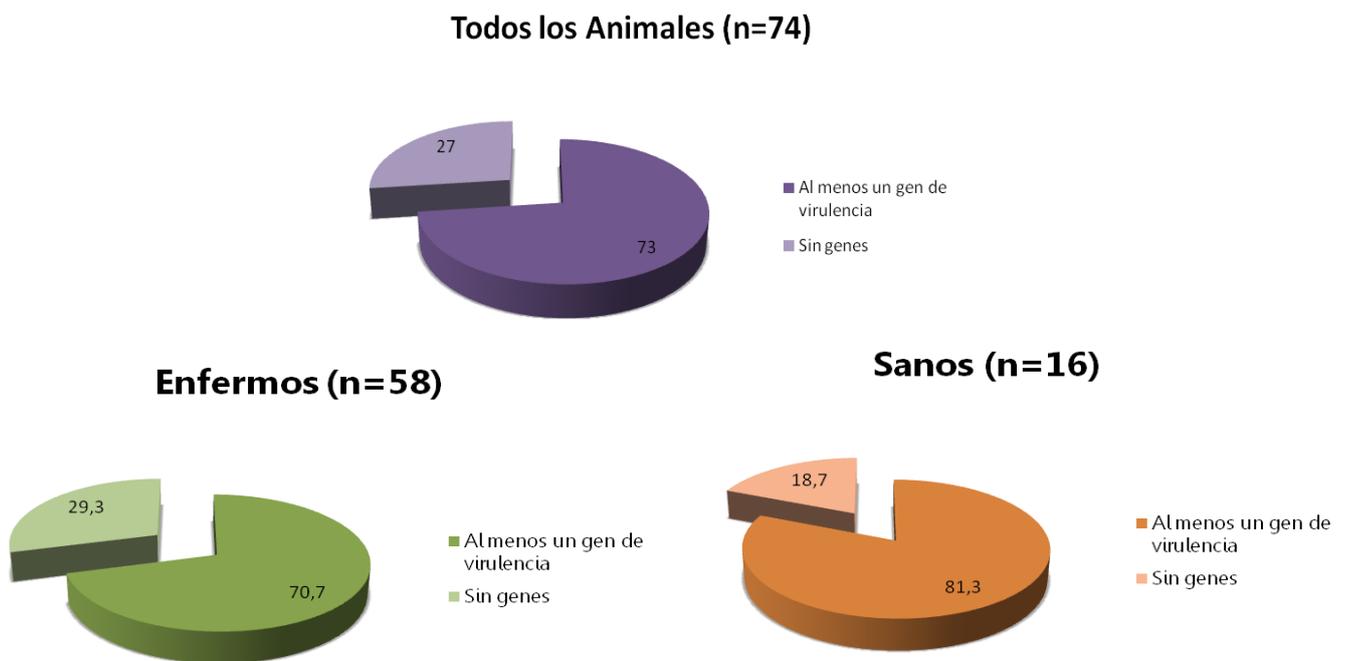


Figura 3. Porcentaje de animales enfermos y de animales sanos, positivos para al menos uno de los genes de virulencia ensayados. Todos los animales: violeta, Enfermos: verde, Sanos: naranja.

Los genes que codifican subunidades de la fimbria F17 y de la adhesina no fimbrial CS31A fueron los que tuvieron mayor representación en la colección (Tabla 9). Las prevalencias de los genes *f17A* (codifica para la subunidad estructural de la fimbria F17) y *f17G(II)* (codifica para la subfamilia II de la adhesina F17G) fueron del 31 % y del 26 % respectivamente, mientras que la del gen *clpG* (codifica para la subunidad estructural de CS31A) fue del 17 %. Por otro lado, los genes que codifican para la fimbria F5 y la subfamilia I de la adhesina F17G presentaron prevalencias muy bajas, 1 % y 4 % respectivamente (Tabla 9).

Tabla 9. Prevalencia de genes que codifican para adhesinas en la colección de 303 aislamientos de *E. coli* aislados de heces de terneros. *: asociación entre los genes *f17A* y *f17G(II)* (Chi-cuadrado $p < 0,05$)

	$n_E=242$ $n_S=61$		Total de aislamientos	Prevalencia Total
	Enfermos	Sanos		
<i>f17A</i>	69	25	94	31 %
<i>f17G(II)</i>	53	25	78	26 %
<i>f17G(I)</i>	11	0	11	4 %
<i>f5</i>	2	0	2	1 %
<i>clpG</i>	42	11	53	17 %
<i>eae</i>	5	3	8	3 %
<i>f17A-f17G(II)*</i>	53	25	78	25,7 %
<i>f17A-f17G(I)</i>	11	0	11	0,3 %
	Prevalencia			
	Enfermos	Sanos		
<i>f17A</i>	28,5 %	41 %		
<i>f17G(II)</i>	22 %	41 %		
<i>f17G(I)</i>	4,5 %	0 %		
<i>f5</i>	0,8 %	0 %		
<i>clpG</i>	17,4 %	18 %		
<i>eae</i>	2,1 %	4,9 %		
<i>f17A-f17G(II)</i>	22 %	41 %		
<i>f17A-f17G(I)</i>	4,5 %	0 %		

Se determinó una asociación entre la presencia de *f17A* y *f17G(II)* (chi-cuadrado, $p < 0,05$). Por otro lado se observó que las prevalencias de los genes *f17A*, *f17G(II)*, *clpG* y *eae* fueron mayores en animales sanos que en enfermos, demostrándose estadísticamente que la presencia de *f17G(II)* no se asocia con el desarrollo de la enfermedad (GLM-Distribución Binomial-Función logit; $y = \exp(-0,90681x - 0,36464) / (1 + \exp(-0,90681x - 0,36363))$).

El gen *eae*, que codifica para la intimina tuvo una prevalencia del 3 % ($n=8$). Seis de los aislamientos fueron clasificados como EPEC, ya que sólo presentaron el gen de la intimina, mientras que los 2 restantes fueron además *stx1* positivos y fueron clasificados como EHEC.

Las toxinas por otro lado, presentaron prevalencias muchos menores que las adhesinas. El gen *stx1*, sólo se encontró en animales enfermos, mientras que el gen *stx2* no se amplificó en ningún aislamiento de la colección (Tabla 10). Los genes *eltA* y *sta*, que codifican para las toxinas termolábil y termoestable de *E. coli* fueron los que presentaron prevalencias mayores (2,6 %, cada uno) (Tabla 10).

Tabla 10. Prevalencia de los genes que codifican para toxinas en la colección de 303 aislamientos de *E. coli* aislados de heces de terneros.

	$n_E=242$ $n_S=61$		Total de aislamientos	Prevalencia Total
	Enfermos	Sanos		
<i>stx1</i>	2	0	2	0,7 %
<i>stx2</i>	0	0	0	0 %
<i>elt</i>	6	2	8	2,6 %
<i>sta</i>	6	2	8	2,6 %
	Prevalencia Enfermos		Prevalencia Sanos	
<i>stx1</i>	0,8 %		0 %	
<i>stx2</i>	0 %		0 %	
<i>elt</i>	2,5 %		3,3 %	
<i>sta</i>	2,5 %		3,3 %	

Discusión

Además de formar parte de la microbiota intestinal *E. coli* puede ser responsable de infecciones intestinales y extraintestinales en seres humanos y en animales (Mainil 2013; Mainil y Fairbrother 2014). Para un correcto diagnóstico de las mismas es esencial detectar los factores de virulencia presentes en las cepas patogénicas circulantes, los cuales se pueden clasificar de acuerdo a los mecanismos de patogenicidad a los que se encuentran asociados. En este trabajo se generó una colección de 303 aislamientos de *E. coli* obtenidos de heces de terneros con síntomas de DNT y de terneros sanos en Uruguay, en el período 2012-2014. Estos aislamientos fueron primeramente identificados de acuerdo a las propiedades bioquímicas de *E. coli*, para luego confirmarse su identidad mediante la secuenciación del gen que codifica para el ARNr 16S.

Se evaluó la presencia de 10 genes de virulencia de *E. coli* que codifican para las fimbrias F5 y F17, la adhesina no fimbrial CS31A, la proteína de membrana externa intimina, las toxinas tipo Shiga 1 y 2, la toxina termoestable y la toxina termolábil, a través de la técnica de PCR a tiempo final. Estudios previos, han demostrado que las fimbrias F5, F17, F41 y la adhesina no fimbrial CS31A son las adhesinas más relevantes en infecciones causadas por *E. coli* en terneros, corderos, cerdos y perros, que son esenciales en las primeras etapas de la colonización (Mercado *et al.* 2003; Nagy y Fekete 2005; Gyles y Fairbrother 2010; Mainil 2013) y que se encuentran significativamente asociadas a la DNT (Kolenda *et al.* 2015). También se ha demostrado una asociación entre estas adhesinas y la enterotoxina termoestable STa y la enterotoxina enteroagregativa EAST1 (Valat *et al.* 2014).

La caracterización molecular de los 303 aislamientos de *E. coli* nos permitió demostrar la presencia de todos los genes evaluados, excepto *stx2*, el cual no amplificó en muestra alguna. Las prevalencias de los genes *clpG* (17 %) y *f17A* (31 %) estuvieron de acuerdo a lo reportado en Francia, Nueva Zelanda, Irán, y en países de la región como Argentina y Brasil, mientras que para el caso del gen *f5* su prevalencia (<1 %) fue menor (Mercado *et al.* 2003; Ghanbarpour y Oswald 2008; Andrade *et al.* 2012; Al Mawly *et al.* 2015; Kolenda *et al.* 2015; Picco *et al.* 2015). Si bien trabajos previos indicaban que la fimbria F5 era la más frecuentemente encontrada en ETEC asociada a diarreas en bovinos, recientemente Kolenda y colaboradores (2015) han reportado resultados similares a los obtenidos en nuestro trabajo, los que revelan una prevalencia menor de los genes que codifican para F5 con respecto de los de F17. Más aun, se ha

demostrado una reducción significativa en la prevalencia de esta fimbria a lo largo de las últimas décadas (Kolenda *et al.* 2015). Este escenario, de acuerdo a lo planteado por varios autores, podría corresponder a una selección negativa debido al uso de vacunas en madres gestantes cuyas composiciones incluyen el antígeno F5 (Bousquet *et al.* 1994; Contrepois *et al.* 1998; Nagy y Fekete 1999). Por otro lado, si bien los genes *f17A*, *f17G(II)* y *clpG* fueron los más prevalentes, sólo una pequeña proporción de las cepas que fueron *f17* positivas fueron también *clpG* positivas, una prevalencia menor comparada con otros estudios (Mercado *et al.* 2003; Kolenda *et al.* 2015). Respecto a la fimbria F17 pudimos además corroborar observaciones previas, las que indicaban una mayor presencia de la subfamilia II de la adhesina de F17G con respecto a la subfamilia I en *E. coli* aisladas de bovinos (Bertin *et al.* 1996b; Bertin 1998). En particular, en nuestro trabajo pudimos demostrar una asociación entre los genes *f17A* y *f17G(I)* (p -valor < 0,05, chi cuadrado).

Es importante resaltar que los genes de las adhesinas F17 y CS31A se encontraron en altas prevalencias en heces de animales sin síntomas de DNT, incluso con valores mayores a la de los enfermos, como por ejemplo los genes *f17A* y *f17G(II)* de la fimbria F17. Una posible explicación para este escenario sería que la fimbria requeriría la intervención de otros factores de virulencia para el desarrollo de la enfermedad. Estudios más exhaustivos deberían llevarse a cabo, como por ejemplo realizar ensayos de expresión para corroborar que la fimbria esté efectivamente expresándose en animales con DNT (Kolenda *et al.* 2015). Por otro lado, se ha observado que la fimbria F17 se encuentra asociada a mastitis y a septicemia causadas por NTEC en bovinos (Bertin *et al.* 1996a; Van Bost *et al.* 2003; Ghanbarpour y Oswald 2010), por lo que la búsqueda de marcadores genéticos de estos patotipos, como por ejemplo los genes que codifican a los factores citotóxicos necrotizantes (CNF, del inglés *cytotoxic necrotizing factor*) y a las toxinas citoletales (CDT, del inglés *cytolethal distending toxin*) sería necesaria para clasificar en mayor profundidad nuestros aislamientos (Van Bost *et al.* 2003). Finalmente, otra explicación para la alta prevalencia de genes de virulencia en animales sanos podría deberse a la ocurrencia de transferencia horizontal de genes entre bacterias. Particularmente podría explicar situaciones como la de la adhesina CS31A, cuyos genes se encuentran codificados exclusivamente en plásmidos (Nagy y Fekete 2005).

La presencia de las enterotoxinas LT y ST de ETEC se evaluó mediante la amplificación parcial de los genes *eltA* y *sta*. Estas toxinas son las responsables de la hipersecreción de electrolitos al lumen intestinal y particularmente ST se ha reportado

con mayor frecuencia en animales enfermos que en animales sanos (Kolenda *et al.* 2015). En este trabajo se determinó que la prevalencia de estos genes fue menor al 3 % en ambos casos. Sólo 14 aislamientos presentaron uno sólo de los genes o ambos en simultáneo, y fueron obtenidos en animales sanos y en animales enfermos; además, se demostró que las prevalencias obtenidas fueron algo inferiores a lo reportado en la región (Picco *et al.* 2015). Continuando en esta misma línea, las prevalencias de los genes *stx1* y *eae*, fueron bastante bajas. En toda la colección se determinaron 6 aislamientos *eae* positivos, que corresponden al patotipo EPEC y sólo 2 aislamientos, de un mismo animal, *eae* y *stx1* positivos en simultáneo, determinando la presencia del patotipo EHEC en la colección. Por otro lado, el patotipo STEC no se encontró en ningún aislamiento. Esta situación difiere de lo observado en Brasil y Argentina, donde las prevalencias de EHEC y STEC son mayores (Blanco *et al.* 2004; Timm *et al.* 2007). Los patotipos EPEC, EHEC y en particular STEC cobran importancia en la clínica cuando se tiene en cuenta que además de ser agentes etiológicos de DNT pueden ser patógenos en humanos. Esto es importante si se considera que los bovinos podrían oficial como reservorios de cepas patógenas para seres humanos (Dean-Nystrom *et al.* 1998; Menge *et al.* 1999; Kolenda *et al.* 2015). Los resultados obtenidos en este trabajo demostrarían que STEC no sería un patotipo circulante en los rodeos de Uruguay mientras que EPEC y EHEC se encuentran presentes aunque en bajas prevalencias.

Respecto a los aislamientos provenientes de animales enfermos que fueron negativos para todos los genes evaluados (prevalencia del 29,3 %) surge la pregunta si se tratan de cepas no patogénicas, pertenecientes a la microbiota comensal del intestino de los bovinos. Esta situación deja abierta la posibilidad de evaluar la presencia de nuevos genes de virulencia. Por ejemplo, los genes que determinan el patotipo *E. coli* necrotoxigénica (NTEC) podrían estar presentes, ya que se han reportado trabajos donde sus genes están asociados a los genes de la fimbria F17 (Van Bost *et al.* 2003), los cuales presentaron altas prevalencias en nuestra colección.

Finalmente, es importante resaltar que además de la presencia y eventual expresión de los genes de virulencia de *E. coli* circulantes en una determinada región, existen otros factores de riesgo involucrados. Los Rotavirus, Coronavirus, *Cryptosporidium parvum* y *Clostridium perfringens* también están asociados a DNT, particularmente luego de la primer semana de vida del ternero (Foster y Smith 2009). Además, el estado sanitario de los animales, las condiciones de limpieza de los rodeos, el manejo por parte del personal de los establecimientos y las condiciones ambientales son todos factores de riesgo que pueden aumentar la incidencia de la DNT (Marcé *et al.*

2010; Lorenz *et al.* 2011). Por lo tanto, la presencia de los genes de virulencia evaluados, sin tener en cuenta los factores anteriormente mencionados y la presencia de otros patógenos, no podrían determinar la ocurrencia de la enfermedad.

CAPÍTULO 2

Diversidad genética, estructura poblacional y
resistencia a antimicrobianos de la colección de
aislamientos de *E. coli*

Introducción

Luego de la identificación y la caracterización fenotípica de los aislamientos y la detección de genes de virulencia, nos propusimos evaluar su diversidad empleando distintas técnicas moleculares. Estas herramientas nos permiten por ejemplo estudiar la clonalidad y estructura poblacional de *E. coli* en brotes puntuales así como en estudios epidemiológicos más ampliados. En particular, la caracterización molecular en estudios de epidemiología es importante para el reconocimiento de brotes de una enfermedad infecciosa, la detección de la transmisión de patógenos en centros nosocomiales, la determinación de una fuente de contaminación y para monitorear programas de vacunación, entre otras finalidades (Olive y Bean 1999).

La técnica de *rep*-PCR desarrollada por Versalovic (1994) describe uno de los métodos de *fingerprinting* que permite tipificar aislamientos bacterianos. Es muy utilizada para analizar la diversidad intra-específica de especies bacterianas y está basada en la existencia de secuencias cortas, altamente repetitivas no codificantes dispersas en el genoma de procariontes. Dado que estas secuencias son altamente conservadas y se encuentran distribuidas de forma variable en las diferentes bacterias, el uso de estas secuencias como cebadores en una reacción de PCR permite amplificar fragmentos de ADN de diferentes tamaños. En particular las secuencias ERIC (*enterobacterial repetitive intergenic consensus*) han sido ampliamente utilizadas, y tal como lo dice su nombre en inglés, corresponden a secuencias intergénicas repetidas altamente conservadas y presentes en enterobacterias. En consecuencia, la amplificación de secuencias mediante el uso de los cebadores diseñados en base a las secuencias ERIC permite realizar estudios de diversidad en aislamientos de *E. coli*. En este sentido, Bae y colaboradores (2014) propusieron recientemente que la técnica de ERIC-PCR sería adecuada para estudios epidemiológicos ampliados como estudios a escala de países, y que además permite agrupar aislamientos que pertenecen a los mismos secuenciotipos. Asimismo se ha descrito su utilidad en comparación con otras técnicas para caracterizar aislamientos de *E. coli* O157:H7 de diferentes orígenes y para establecer relaciones filogenéticas entre aislamientos de *E. coli* en aves (Da Silveira *et al.* 2002; Ateba y Mbewe 2014).

Por otro lado, la técnica de *Multilocus Sequence Typing* (MLST) se emplea comúnmente para estudiar variabilidad en los genomas microbianos y se basa en la comparación de secuencias nucleotídicas de múltiples genes conservados y la ocurrencia de pequeñas variaciones en ellas (Maiden *et al.* 1998). Es una técnica

altamente reproducible que toma en cuenta la variabilidad entre los genes particulares seleccionados y que puede ser utilizada para determinar relaciones entre bacterias (Foley *et al.* 2009). Es una técnica muy usada para la caracterización de clones epidémicos de *E. coli* (Chaudhuri y Henderson 2012) que ha permitido además la identificación de cepas filogenéticamente cercanas de diferentes orígenes (Clermont *et al.* 2011). Estas observaciones no son nuevas, y han sido observadas por varios autores utilizando técnicas como la electroforesis en campo pulsado (PFGE), *ribotyping* y serotipificación, entre otras (Maynard *et al.* 2004; Moulin-Schouleur *et al.* 2006; Johnson *et al.* 2008). La importancia de la utilización de MLST radica en que permite comparar secuencias de diferentes orígenes y de distintas partes del mundo en simultáneo gracias a las bases de datos disponibles en las plataformas construidas para tales fines.

La antibioticoterapia es una estrategia utilizada en medicina veterinaria para el tratamiento de enfermedades como la DNT. Comercialmente existen disponibles una gama de antibióticos de administración oral y parenteral para tratar la DNT en bovinos, los cuales suelen administrarse empíricamente (Constable 2004). Si bien esta estrategia puede ser beneficiosa para el productor, ya que disminuye la mortalidad de terneros en los rodeos, también promueve la selección de cepas multirresistentes. Específicamente en bovinos las tasas de multirresistencia pueden ser elevadas y han sido atribuidas principalmente al uso de antibióticos como “promotores del crecimiento” (Karczmarczyk *et al.* 2011; Marshall y Levy 2011), estrategia actualmente no recomendada en Uruguay. En este sentido, el conocimiento del perfil de resistencia a antimicrobianos de las cepas circulantes es imprescindible para alcanzar el éxito terapéutico y disminuir la diseminación de clones resistentes (Mateu y Martin 2001; Constable 2004).

Otra temática de intenso estudio en los últimos años es la diseminación de genes de resistencia a antimicrobianos mediante la transferencia horizontal de genes. En este campo, ha tomado particular importancia la transferencia de genes de resistencia de cepas bacterianas de origen animal a cepas humanas por la contaminación de las cadenas productivas y por la evolución de los sistemas productivos dirigidos a la intensificación, donde, si las condiciones de manejo no son las adecuadas, la contaminación cruzada entre animales y seres humanos es más frecuente (Marshall y Levy 2011). Entre estos mecanismos de transferencia se destacan los integrones de clase 1, que tradicionalmente se los ha asociado a aislamientos clínicos multirresistentes en humanos (Di Conza y Gutkind 2010). Los integrones funcionan como sistemas de captación de genes que confieren ventajas selectivas para

la bacteria que los porta y dada su amplia variedad de secuencias de recombinación, su capacidad de intercambio y origen remoto, estas estructuras permiten a las bacterias una rápida adaptación a los cambios ecológicos (Di Conza y Gutkind 2010). Además de estar asociados a aislamientos bacterianos clínicos, también se los ha detectado en animales y muestras ambientales, asociados en muchos casos a multirresistencia a antibióticos (Nastasi y Mammina 2001; Nield *et al.* 2001; Nandi *et al.* 2004; Ahmed *et al.* 2007). Por otro lado, la resistencia a quinolonas mediada por plásmidos (PMQR) también se ha reportado en muestras de origen animal (Chen *et al.* 2012; Montes de Oca *et al.* 2015). Las resistencias asociadas a PMQR toman mayor relevancia en países como Argentina y EEUU donde se las han observado en altas prevalencias tanto en aislamientos humanos como animales ya que además se encuentran asociadas a la expresión de β -lactamasas de espectro extendido BLEE (Park *et al.* 2006; Andres *et al.* 2013; Liu *et al.* 2013; Shaheen *et al.* 2013).

Resultados

Diversidad intra-específica de la colección

Los patrones de bandas obtenidos para cada uno de los 303 aislamientos de *E. coli* con los cebadores ERIC mostraron una alta variabilidad en toda la colección, como se ejemplifica con algunos aislamientos en la figura 4. Se observaron algunos patrones de bandas similares entre aislamientos (Fig. 4), aunque no se pudo determinar un patrón claro en la totalidad de la colección.

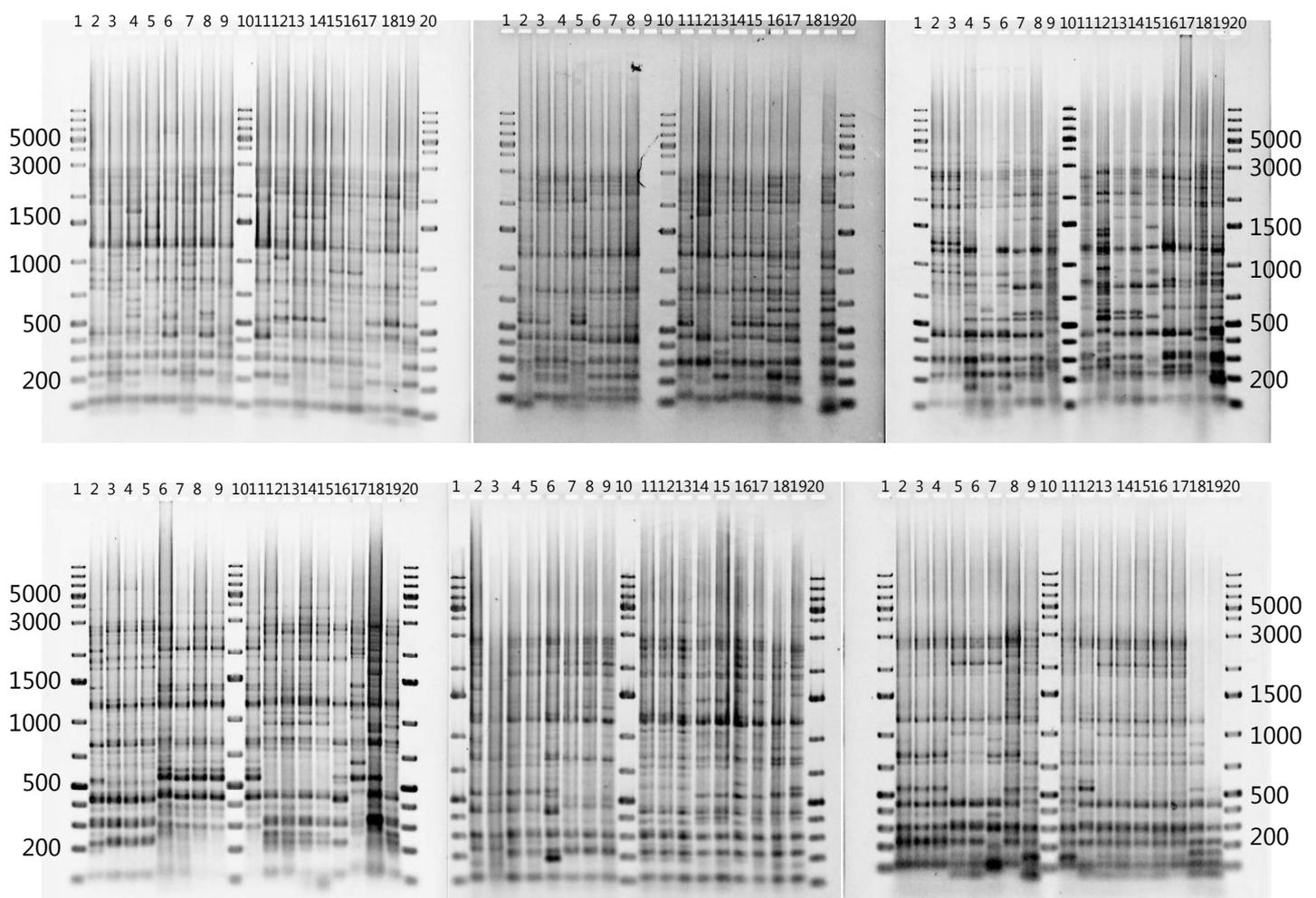


Figura 4. Patrones de bandas de los aislamientos de *E. coli*, obtenidos con ERIC-PCR visualizados en geles de agarosa 1,0 % teñidos con GelRed. Carriles 1,10 y 20 de cada gel: marcador 1kb Plus (Thermo Scientific). Carriles 2-9 y 11-19 de cada gel: aislamientos de *E. coli*.

A partir de todos los patrones de bandas con ERIC-PCR se generaron dendogramas con el Programa GelCompar II (Applied Maths, Versión 6.5), utilizando el método UPGMA como se detalló en materiales y métodos. Aquellos aislamientos que presentaron un porcentaje de similitud igual o mayor al 98 % se consideraron el mismo aislamiento y los que presentaron un porcentaje de similitud igual o mayor al 75 % se consideraron la misma variante genética, de acuerdo a lo propuesto por Chandran y Mazumder (2014).

Los análisis de los dendogramas demostraron que existe una alta heterogeneidad genética. En las figuras 5 y 6 se pueden observar distintas variantes genéticas en un mismo establecimiento, así como variantes genéticas iguales presentes en animales sanos y en animales con síntomas de DNT. Más aun, por ejemplo, en el departamento de Canelones se observaron que variantes genéticas de *E. coli* se encontraban circulando en establecimientos vecinos, ambos con animales muertos por DNT al momento de la colecta de heces (comunicación personal con dueño de los establecimientos) (Fig. 6A). Para ver el dendograma con todos los aislamientos dirigirse al Anexo III.

De acuerdo al criterio establecido para determinar las variantes genéticas el Departamento de Soriano presentó 17 variantes genéticas diferentes, mientras que Colonia 12 variantes diferentes, San José 11, Tacuarembó 8, Canelones 6, Florida 5, Paysandú 2 y Artigas 1 (Tabla 11).

Tabla 11. Índice de diversidad de Shannon. Número total de aislamientos únicos (criterio del 98 %) y de variantes genéticas diferentes (criterio del 75 %) en los departamentos muestreados. H' = índice de diversidad de Shannon.

Departamento	Nº total aislamientos	Nº variantes genéticas únicas	H'
Canelones	42	6	1,45
Colonia	59	12	2,35
Florida	14	5	1,37
Tacuarembó	31	8	1,84
Artigas	3	1	0,0
Soriano	43	17	2,36
San José	54	11	2,20
Paysandú	19	2	0,25

Los índices de diversidad de Shannon por departamento se calcularon teniendo en cuenta las variantes genéticas generadas con los análisis de ERIC-PCR y variaron entre $H'=0$ (en el depto. de Artigas) hasta 2,36 (en el depto. de Soriano). Los departamentos que exhibieron una mayor diversidad entre los aislamientos de *E. coli* fueron Soriano ($H'=2,36$) seguido por Colonia ($H'=2,35$), San José ($H'=2,20$) y Tacuarembó ($H'=1,84$). El resto de los departamentos presentaron valores intermedios de diversidad de acuerdo a los parámetros establecidos para este índice. Por otro lado, el índice de diversidad total de la colección fue $H'=2,89$. Los departamentos más diversos por este índice fueron aquellos que además presentaron más cantidad de aislamientos.

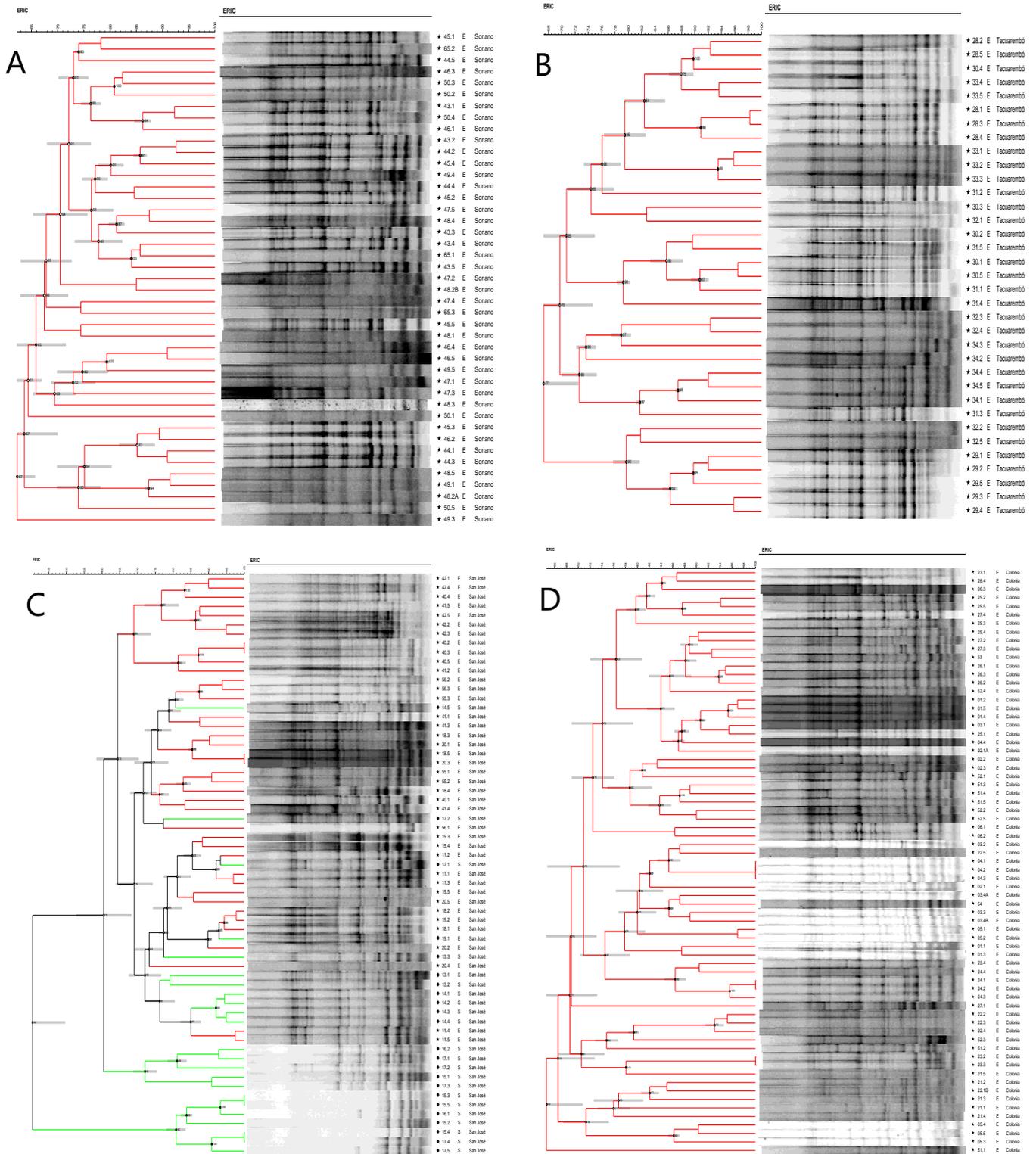


Figura 5. Dendrograma de los perfiles de bandas obtenidos con ERIC-PCR de los aislamientos provenientes de los Departamentos de Soriano(A), Tacuarembó(B), San José(C) y Colonia(D) generados con el Método UPGMA (GelCompar II), utilizando los patrones de bandas. E: enfermos (rojo), S: sanos (verde).

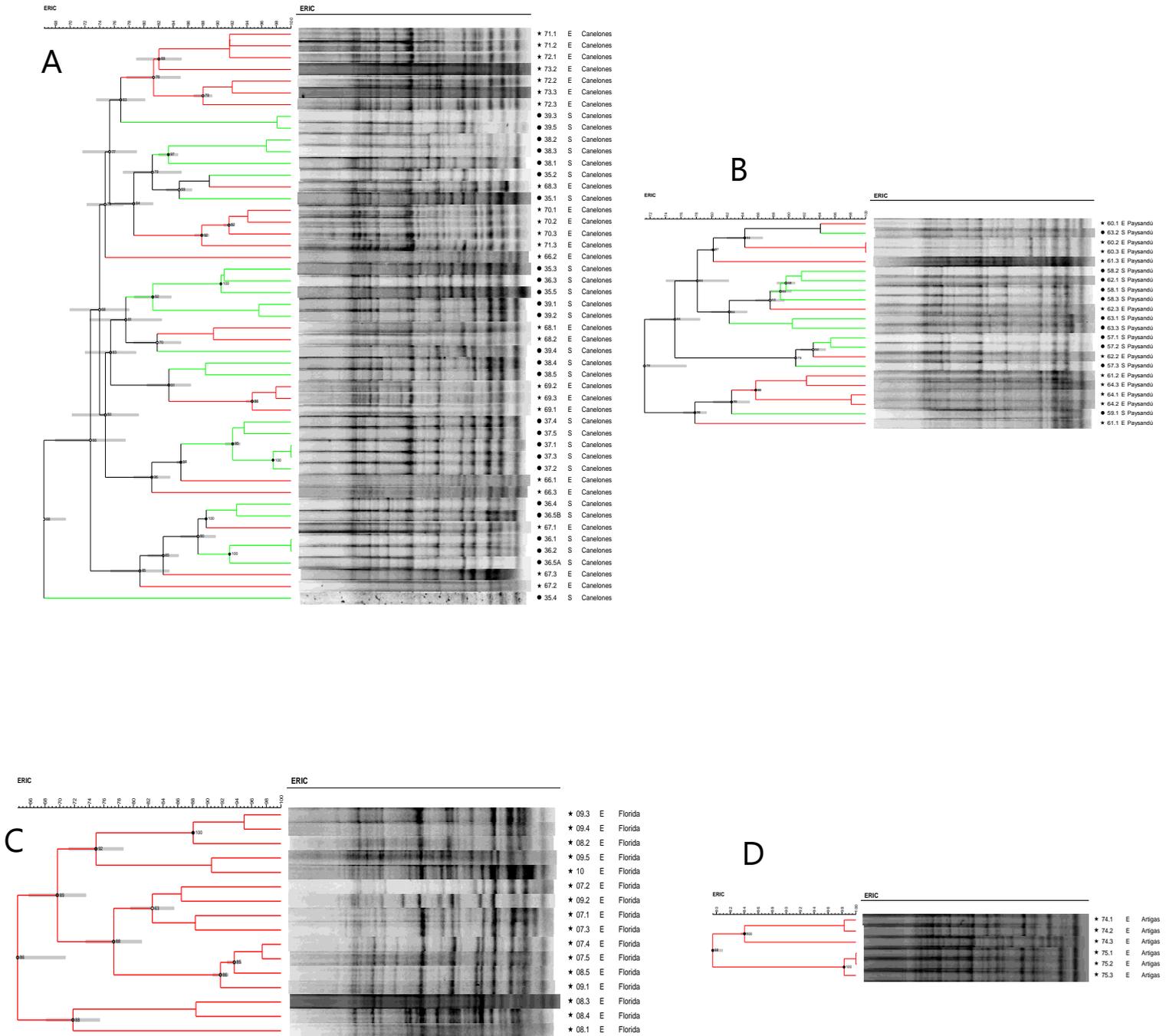


Figura 6. Dendrograma de los perfiles de bandas obtenidos por ERIC-PCR de los aislamientos provenientes de los Departamentos de Canelones(A), Paysandú(B), Florida(C) y Artigas(D) generados con el Método UPGMA (GelCompar II). E: enfermos (rojo), S: sanos (verde).

Estructura poblacional de la colección de *E. coli* mediante MLST

Con el fin de continuar estudiando la diversidad genética y la estructura poblacional de la colección se realizó la técnica de MLST para caracterizar 22 aislamientos de *E. coli*. La selección de estos aislamientos se realizó a partir de los resultados obtenidos previamente. Se tuvo en cuenta el estado de los animales, incorporando aislamientos provenientes de animales enfermos y animales sanos, la presencia de genes de virulencia (todas las combinaciones de genes de virulencia circulantes encontradas), los Departamentos muestreados y los años de colecta. Asimismo, se tuvo en cuenta que los aislamientos pertenecieran a distintas variantes genéticas de acuerdo a los resultados de ERIC-PCR. Las características de los aislamientos seleccionados se detallan en la Tabla 12.

Tabla 12. Características de los aislamientos seleccionados para los análisis de MLST y subsiguientes ensayos del Capítulo 3. E: enfermo, S: sano. *: necropsia.

Departamento	Est.	Aislamiento	Estado	Fecha	Genes de virulencia																
					<i>f5</i>	<i>clpG</i>	<i>f17A</i>	<i>f17G(II)</i>	<i>f17G(I)</i>	<i>eae</i>	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>sta</i>	<i>elt</i>							
Colonia	2	6.2	E	2012																X	
	3	21.1	E					X	X												
	4	51.2	E		X																
		52.3	E					X	X												
	5	53*	E																		
Florida	6	7.4	E																X		
		8.1	E	X	X	X								X	X						
San José	7	14.3	S			X	X												X		
	8	42.3	E											X	X						
		55.1	E	X										X							
Tacuarembó	9	56.1	E			X	X						X								
		28.1	E			X	X														
Tacuarembó	10	28.1	E																		
Soriano	11	48.1	E		X	X		X													
Canelones	13	36.4	S	2013									X								
		67.1	E										X								
		69.2	E		X	X															
		71.1	E																		
Paysandú	15	57.1	S			X	X											X			
		59.1	S	X	X	X															
		64.2	E	X	X	X															
Artigas	16	74.1	E	2014								X	X								
		74.3	E		X	X															

Primeramente se puso a punto la técnica de PCR para cada uno de los genes tomados en cuenta para determinar los perfiles de MLST, obteniéndose una banda del tamaño esperado en cada caso. Luego de corroborar que los productos de amplificación presentaban el tamaño esperado en electroforesis en geles de agarosa, los productos de PCR se enviaron a Macrogen (Corea) donde se purificaron y secuenciaron. Una vez obtenidas las secuencias, las mismas se procesaron de acuerdo a lo establecido en el sitio *web* de la Universidad de Warwick y se cargaron a su plataforma. Se encontraron 17 ST diferentes circulando, incluyendo 4 clasificados como nuevos (aislamientos 53, 55.1, 57.1 y 69.2), los cuales fueron incorporadas a la base de datos (Tabla 13). Cuatro cepas no pudieron ser clasificadas debido a que los alelos de los genes *adk* y *fumC* (aislamientos 21.1, 36.4, 67.1 y 71.1) no habían sido reportados antes en ningún estudio. Se deberán realizar 3 nuevos procesos de secuenciación independientes para su ingreso a la base de datos y posterior designación de ST a los aislamientos.

De los ST previamente reportados, 4 fueron descritos exclusivamente en muestras de origen animal (bovinos, aves, bovinos, jirafa y bisón). Tres de ellos, estuvieron asociados a casos de septicemia y mastitis (ST1086, ST1087 y ST1140), y 1 (ST56) fue previamente reportado en animales sanos. El resto de los ST reportados en nuestro trabajo (n=9) fueron descritos previamente en muestras humanas, animales (domésticos y salvajes) y en agua; y en todos los casos son ST asociados a enfermedad causadas por distintos patotipos de *E. coli* (ExPEC, STEC, APEC, EAEC, EHEC). Asimismo, se detectaron los secuenciotipos ST362, ST453, ST2449 y ST4467, que han sido reportados en caso de cepas productoras de BLEE. Se detectó además que 2 aislamientos pertenecientes a un mismo establecimiento en Paysandú presentaron el mismo secuenciotipo (ST101). Dichos aislamientos correspondían uno a un animal enfermo y otro a un animal sin síntomas de DNT (Tabla 13). Por otro lado los nuevos secuenciotipos asignados a nuestros aislamientos se clasificaron como ST5846 (para el aislamiento 53), ST5849 (aislamiento 55.1), ST5851 (aislamiento 57.1) y ST5852 (aislamiento 69.2) (Tabla 13).

Tabla 13. Secuenciotipos de *E. coli*. Número de los alelos obtenidos para cada gen secuenciado, secuenciotipo determinado a partir de las distintas combinaciones de alelos y nomenclatura de los aislamientos en la base de datos de la Universidad de Warwick. En gris se marcaron los genes a los cuales no se le detectaron alelos previamente descritos. *: necropsia.

Departamento	Est.	Aislamiento	Estado	Fecha	Número de alelo de cada gen							ST	Nomenclatura Cepa Uruguay
					<i>adk</i>	<i>fumC</i>	<i>gyrB</i>	<i>icd</i>	<i>mdh</i>	<i>purA</i>	<i>recA</i>		
Colonia	2	6.2	E	2012	6	19	32	26	11	8	6	ST4467	6_2UY
	3	21.1	E			4	4	16	24	8	14		
	4	51.2	E		62	100	17	31	5	5	4	ST362	51_2UY
		52.3	E		99	6	33	33	24	8	7	ST453	52_3UY
	5	53*	E		10	11	15	8	8	8	2	ST5846	53UY
Florida	6	7.4	E		9	65	5	1	9	13	6	ST162	7_4UY
		8.1	E		21	35	27	6	5	5	4	ST69	8_1UY
San José	7	14.3	S		6	4	32	185	24	13	7	ST1086	14_3UY
	8	42.3	E		62	372	17	31	5	5	4	ST2449	42_3UY
		55.1	E		10	11	4	131	8	8	2	ST5849	55_1UY
Tacuarembó	9	56.1	E	9	4	33	18	11	8	6	ST336	56_1UY	
		10	28.1	E	6	4	4	18	24	5	14	ST56	28_1UY
Soriano	11	48.1	E	83	23	164	181	80	1	42	ST1140	48_1UY	
Canelones	13	36.4	S	2013		4	12	16	9	7	7		
	14	67.1	E			372	12	131	9	7	7		
		69.2	E		9	6	33	8	24	7	7	ST5852	69_2UY
	15	71.1	E		6		5	1	8	18	2		
Paysandú	16	57.1	S	9	6	33	18	24	8	7	ST5851	57_1UY	
		59.1	S	43	41	15	18	11	7	6	ST101	59_1UY	
		64.2	E	43	41	15	18	11	7	6	ST101	64_2UY	
Artigas	17	74.1	E	2014	16	4	12	16	9	7	7	ST21	74_1UY
		74.3	E		80	186	54	10	143	35	47	ST1087	74_3UY

Los análisis filogenéticos de la secuencias nucleotídicas de cada gen concatenadas también corroboraron la gran heterogeneidad genética observada en los ST y ERIC-PCR (Fig. 7), aunque se pudo determinar un cierto grado de agrupación. Los aislamientos identificados como ST101 y que provenían de un mismo establecimiento en Paysandú (59.1 y 64.2) se agruparon juntos, mientras que aislamientos provenientes de diferentes regiones geográficas como 53 y 55.1 (aislados en Colonia y San José, respectivamente), ambos clasificados con nuevos ST, se agruparon también juntos.

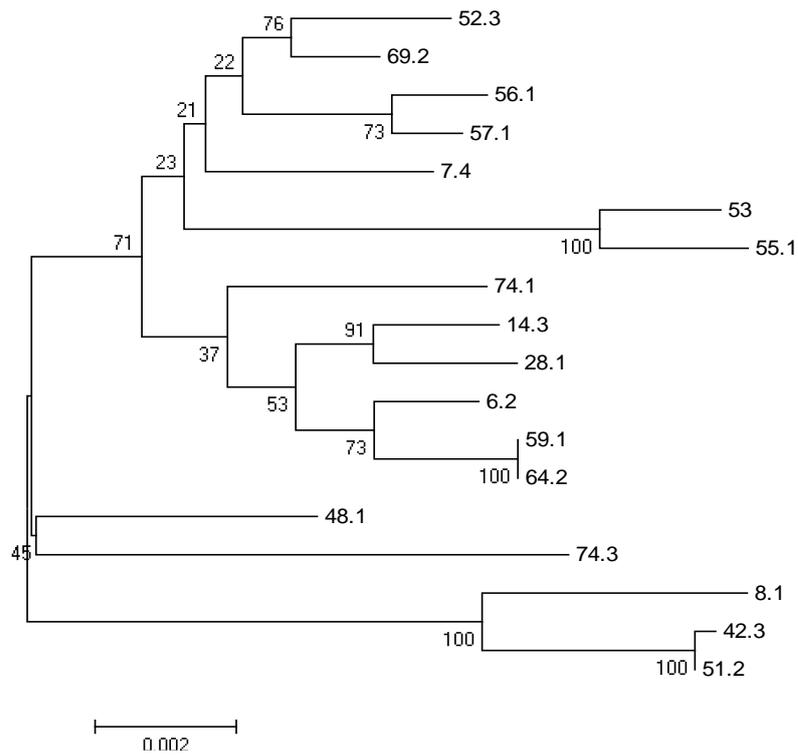


Figura 7. Relaciones filogenéticas de los aislamientos de *E. coli* generadas partir de las secuencias de los 7 genes *housekeeping* concatenadas. Dendograma obtenido con el método de *Neighbor-Joining* y un número de 1000 réplicas de *bootstrap*.

Resistencia a antimicrobianos de la colección

Sensibilidad reducida a Ciprofloxacina

Se realizó un primer tamizaje a la colección de 303 aislamientos de *E. coli*, para evaluar su resistencia a ciprofloxacina. Estos aislamientos fueron sembrados en agar Müller Hinton suplementado con ciprofloxacina (0,125 µg/ml) durante 24 hs a 37°C, utilizando como control la cepa de referencia *E. coli* ATCC 25922. Un total de 132 aislamientos (43,6 %) crecieron en el medio suplementado con dicho antibiótico (Fig. 8). De éstos, 20 aislamientos no fueron tenidos en cuenta para los posteriores ensayos de antibiogramas por presentar el mismo perfil de virulencia y pertenecer a la misma variante genética (ERIC-PCR).



Figura 8. Imagen del sistema por goteo empleado para la siembra de los 303 aislamientos de *E. coli* en placas de agar Müller Hinton suplementadas con ciprofloxacina (0,125 µg/ml). Esquina superior izquierda: placa de agar Müller Hinton suplementado con ciprofloxacina (0,125 µg/ml) luego de 24 hs de incubación con *E. coli*. Los puntos corresponden a aislamientos resistentes a CIP en la concentración ensayada.

Perfiles de resistencia a antibióticos

Los estudios ampliados de susceptibilidad se realizaron a 112 cepas de *E. coli*, seleccionadas previamente por el tamizaje con CIP, el perfil de genes de virulencia y la ocurrencia de pertenecer a diferentes variantes genéticas por ERIC-PCR, utilizando el método de disco-difusión de Kirby-Bauer en agar Müller-Hinton. Cuando se procedió a la lectura de los antibiogramas se observó que no todos los aislamientos fueron resistentes a CIP por disco-difusión, apreciación que podría explicarse por el punto de corte seleccionado en el tamizaje primario. Por esa razón, se resolvió presentar los resultados de los 83 aislamientos que fueron resistentes a CIP por disco-difusión.

Teniendo en cuenta las cepas finalmente seleccionadas, 59 de 83 (71%) fueron multirresistentes (presentaron resistencia a 3 o más clases de antibióticos) (Fig. 9A). Por otro lado, las co-resistencias fueron 82/83 (98,8%) a ENR, 66 (79,5%) a AMP, 57 (68,7%) a SXT, 20 (24%) a AZM, 16 (19%) a CN y 9 (10,8%) a oximiinocefalosporinas (6 a CXM y 3 a CRO y/o CAZ), 3 (0,3%) a FOS y una a AK (Figura 9B). No se observaron cepas resistentes a FEP, IMP o MEM.

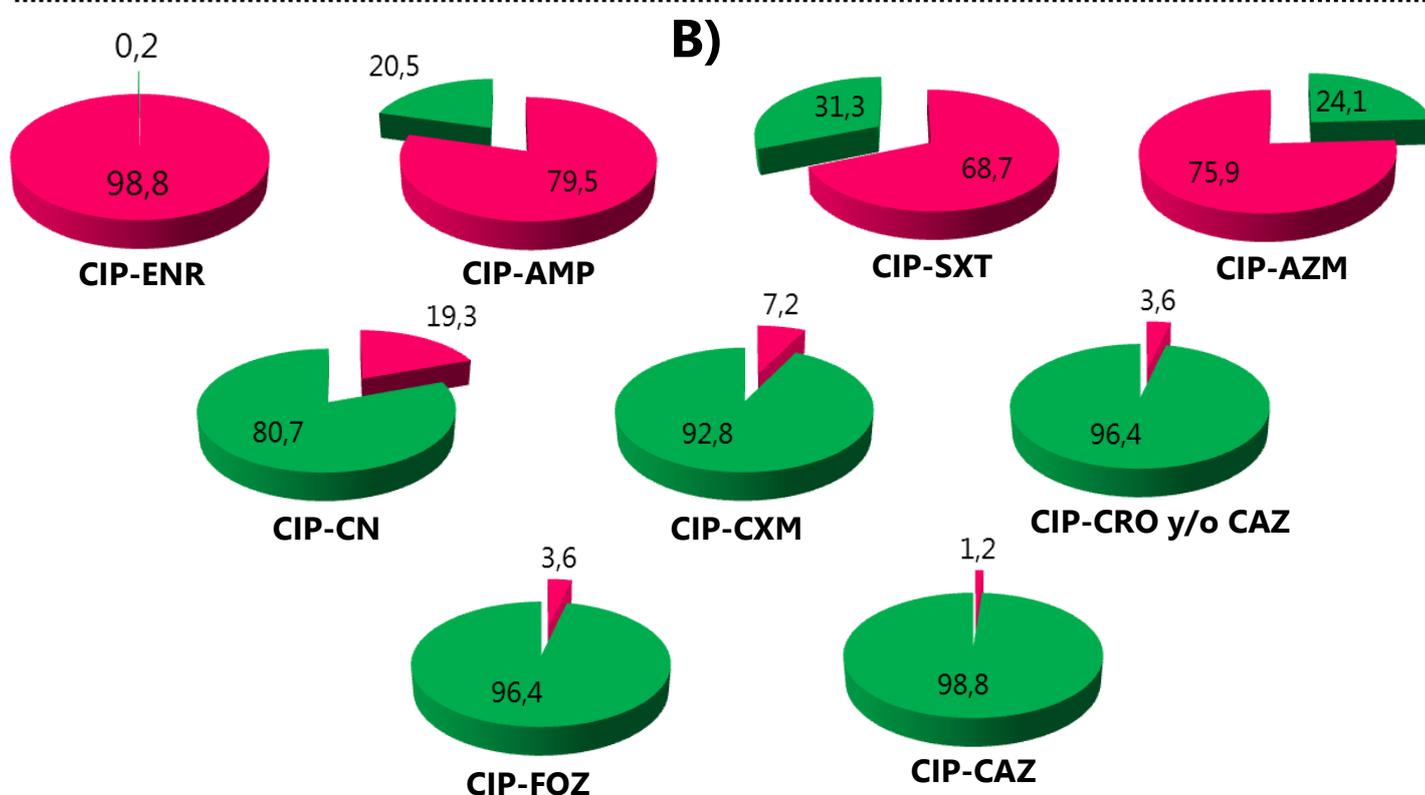


Figura 9. A: Porcentajes de aislamientos multirresistentes a antibióticos por ensayo de disco-difusión (violeta), aislamientos no multirresistentes (verde). B: Co-resistencias CIP-ENR, CIP-AMP, CIP-SXT, CIP-AZM, CIP-CN, CIP-CXM, CIP-CRO y/o CAZ, CIP-FOZ, CIP-AK (fucsia), otras resistencias (verde).

Mecanismos de resistencia transferibles a quinolonas y β -lactámicos

Respecto a la evaluación de los genes PMQR, se determinó la presencia de los genes *qnrB* y *qnrS*, mientras que los genes *qnrA*, *qnrC*, *qnrD* y *qepA* no se encontraron en ninguno de los 112 aislamientos de *E. coli* evaluados. El gen *qnrB* se encontró en 6 aislamientos (4.1, 4.4, 7.4, 9.1, 9.2 y 73.2) y el gen *qnrS* en 1 aislamiento (68.1). Todos los aislamientos en los que se encontraron estos genes provenían de animales con síntomas de DNT. En particular, los aislamientos 7.4, 9.1 y 9.2 *qnrB* positivos fueron multirresistentes a antibióticos por el ensayo de disco-difusión, mientras que el resto (4.1, 4.4, 68.1 y 73.2), aunque presentaron resistencias a algunos de los antibióticos testeados, no fueron considerados multirresistentes. Finalmente, se confirmó por secuenciación y posterior análisis de las secuencias que todos los aislamientos *qnrB* positivos eran *qnrB2-like* y que el aislamiento 68.1 era *qnrS1*.

Por otro lado, mediante el test de sinergia con doble disco se determinó que sólo 3 aislamientos fueron productores de BLEE (21.3, 22.1A y 22.1B), los cuales fueron aislados de 2 animales con DNT en Colonia. Subsiguientemente, la amplificación con los cebadores *bla*_{CTX-M} y posterior secuenciación confirmaron que los 3 pertenecen al grupo CTX-M-14. Todos los aislamientos productores de β -lactamasas de espectro extendido fueron además multirresistentes a antibióticos por el ensayo de disco-difusión.

Resistencia a antibióticos mediada por integrones

Como se mencionó en materiales y métodos, la búsqueda de genes que codifican para los integrones clase 1 y clase 2 se realizó en la Facultad de Veterinaria de la UNCPB en Tandil, Argentina. A partir de los 20 aislamientos seleccionados para los ensayos de MLST (Tabla 12) se determinó por PCR que 5 de ellos (7.4, 42.3, 48.1, 53 y 64.2) fueron *int1*, *qacE Δ 1* y *sul1* positivos, demostrando que presentaban ambos extremos del integrón clase 1. El resto de los aislamientos evaluados no presentaron ninguno de los genes evaluados tanto para el integrón clase 1 como el clase 2.

Posteriormente, la secuenciación de las RV del integrón clase 1 de los 5 aislamientos positivos y el posterior análisis de las secuencias develó la presencia de distintos arreglos de genes. En particular se detectaron 4 casetes de genes diferentes: *dfrA7*; *dfrA17-aadA5*; *dfrA1-aadA1* y *dfrA12-orfF* (hypotetical protein)-*aadA2*.

Discusión

En este capítulo se estudió la diversidad intra-específica de una colección de aislamientos de *E. coli* obtenidos de heces de terneros sanos y de bovinos con DNT en Uruguay. Constituyó el primer trabajo donde se evaluó además, la estructura poblacional y los perfiles de resistencia a antibióticos de este patógeno en bovinos a nivel nacional.

Los análisis de ERIC-PCR establecieron que existe una alta heterogeneidad en los aislamientos circulantes tanto en los animales sanos como en aquellos que padecen DNT. Se pudo determinar que existen variantes genéticas presentes en animales sanos y también en animales enfermos. Esto en principio podría demostrar que existen variantes circulantes con la potencialidad de causar enfermedad, aunque otros factores podrían estar jugando un rol importante en el desarrollo de la enfermedad. Como se discutió en el primer capítulo, el estado sanitario de los animales y de los establecimientos, las normas de manejo, las condiciones ambientales y la co-infección con otros patógenos son factores de riesgo que podrían colaborar para el desencadenamiento de la enfermedad (Marcé *et al.* 2010; Lorenz *et al.* 2011), lo que explicaría el hecho de que variantes genéticas con potencialidad de causar enfermedad no lo hagan. Por otro lado, se observó que en establecimientos con muchos casos de DNT y provenientes de rodeos vecinos, como fue el caso de los establecimientos 14 y 15 en Canelones, estarían circulando las mismas variantes, lo que demostraría que podría predominar una variante patogénica en una zona geográfica determinada en casos de alta gravedad.

Los resultados de ERIC-PCR fueron corroborados posteriormente con los resultados de MLST. Al igual que el ERIC-PCR, la técnica de *multilocus sequence typing* es altamente reproducible y se utiliza para determinar relaciones entre bacterias (Foley *et al.* 2009) y para caracterizar clones epidémicos de *E. coli* (Chaudhuri y Henderson 2012). La técnica de MLST posee además la particularidad que permite comparar cepas de diversos orígenes debido a que las bases de datos de los secuenciotipos descritos son públicas y gratuitas. En estas plataformas se brinda información respecto del origen de las muestras, ya sean animales, de seres humanos o ambientales, así como de la región geográfica de donde fueron tomadas dichas muestras (países). De esta manera, la técnica de MLST es efectiva para realizar estudios de diversidad intra-específica y estructura poblacional, y puede ser complementaria a otras técnicas como

PFGE y ERIC-PCR, entre otras (Maynard *et al.* 2004; Moulin-Schouleur *et al.* 2006; Johnson *et al.* 2008).

De los 22 aislamientos evaluados, sólo 2 aislamientos presentaron el mismo secuenciotipo (ST101), el cual se encontró en 2 animales provenientes de un mismo rodeo y con el mismo perfil de genes de virulencia, uno de ellos sano (aislamiento 59.1) y otro con síntomas de DNT y con un perfil multirresistente a antibióticos (aislamiento 64.2). En total, se encontraron 17 ST diferentes. Es importante resaltar que a 4 de esos 17 aislamientos le fueron asignados nuevos ST y que otros 4 aislamientos presentan nuevos alelos de los genes (*adk* y *fumC*). Una vez que se realice la asignación de estos alelos en estos aislamientos, se generarán 4 nuevos ST y se alcanzará el número de 21 ST diferentes de 22 aislamientos de *E. coli* estudiados. Esto refleja nuevamente la gran heterogeneidad genética de los aislamientos de *E. coli* que se encuentran circulando en los rodeos en Uruguay. Respecto a los ST previamente descritos, se determinó la presencia de secuenciotipos asociados exclusivamente a animales y otros a animales y humanos. Entre éstos, se destacó la ocurrencia del ST69, ampliamente caracterizado en infecciones por ExPEC, en particular por *E. coli* uropatogénica (UPEC) en humanos (Tartof *et al.* 2005). Asimismo, el aislamiento 74.1 resultó ser ST21, perteneciente al complejo de ST29. Este complejo se ha descrito principalmente en cepas altamente virulentas de EHEC. Los ST21 y ST29 están altamente relacionados de acuerdo al *core* de genes definido por MLST (comparten 6 de los 7 *loci*). En particular el ST29 emergió en Alemania a mediados de la década de 1990 como un clon EHEC O26:H11/H⁻ patógeno humano (Zhang *et al.* 2000). Más recientemente se lo ha detectado también en muestras de animales sanos en Suiza y en nuevos clones virulentos de EHEC O26:H11/H⁻ en Europa (Bielaszewska *et al.* 2013; Zweifel *et al.* 2013). Por otro lado, el ST21 es comúnmente encontrado en aislamientos STEC O26 en bovinos (Geue *et al.* 2009; Chase-Topping *et al.* 2012). Sin embargo, a diferencia del aislamiento 74.1 encontrado en nuestra colección, los clones EHEC de Europa no presentaban los genes que codifican para las toxinas tipo Shiga. Una explicación que se ha propuesto para esta observación sería que aislamientos como 74.1 adquieren fagos que a su vez le transfieren genes que codifican para las toxinas tipo Shiga (Mellmann *et al.* 2009; Bielaszewska *et al.* 2012).

Por otro lado, a partir del cálculo del índice de diversidad de Shannon se determinó que los departamentos más diversos fueron Soriano, Colonia y San José, y que el índice de diversidad global de la colección de aislamientos ($H' = 2,89$) fue

elevado respecto a otros estudios de *E. coli* aisladas de heces de aves (Chandran y Mazumder 2014).

En nuestro trabajo se determinaron los perfiles de resistencia a antibióticos de la colección de *E. coli*. Se testaron 16 antibióticos diferentes de uso en veterinaria y en la clínica humana. Teniendo en cuenta los aislamientos resistentes a ciprofloxacina, 71 % fueron multirresistentes (presentaron resistencia a al menos 3 clases diferentes de antibióticos). Por otro lado, entre las co-resistencias se destacaron las de CIP-ENR (98,8 %), CIP-AMP (79,5 %) y CIP-SXT (68,7 %). En particular, la resistencia a ENR, antibiótico ampliamente utilizado en veterinaria, fue muy elevada. La enrofloxacin pertenece a la familia de las fluoroquinolonas y su uso contra distintas afecciones en animales está aprobado por la EMEA (European Medicines Agency) en Europa (www.ema.europa.eu); mientras que la FDA (Food and Drug Administration) tiene permitido su uso para tratar enfermedades respiratorias en terneros destetados de hasta 2 meses de edad (www.fda.gov/cvm). La efectividad del uso de la ENR en casos de diarrea en terneros menores de un día de nacidos ha sido probada, y si bien los resultados han sido significativos, su utilización en animales de producción en EEUU no está permitida (Constable 2004). Un aspecto a resaltar de este antibiótico es el obtenido en estudios realizados en EEUU, España y Países Bajos, donde se determinó que la terapia con fluoroquinolonas como la enrofloxacin y la sarafloxacin en aves ha sido responsable de la ocurrencia de *Campylobacter* spp. resistentes a fluoroquinolonas en infecciones en humanos (Endtz *et al.* 1991; Sánchez *et al.* 1994; Smith *et al.* 1999). En Uruguay, la enrofloxacin es un antibiótico de venta libre y si bien es conocido su uso en bovinos y aves de corral, no existen registros de frecuencias ni concentraciones de utilización a nivel nacional.

Por otro lado, se determinó la presencia de elementos génicos móviles en la colección mediante la identificación del integrón clase 1 en 5 de los 20 aislamientos de *E. coli* analizados por PCR. Cuando se secuenciaron sus regiones variables se determinó la presencia de 4 arreglos de genes de resistencia a antibióticos: *dfrA7*, *dfrA17-aadA5*, *dfrA1-aadA1* y *dfrA12-orfF-aadA2*. Estos arreglos de genes han sido previamente reportados y le pueden conferir a los aislamientos resistencia a aminoglicósidos y trimetoprim (Kang *et al.* 2005). En particular, los arreglos de genes *dfrA17-aadA5* y *dfrA12-orfF-aadA2* se han reportado en cepas provenientes de terneros y aves de corral (Kang *et al.* 2005; Barlow *et al.* 2009). Asimismo, el arreglo *dfrA17-aadA5* se ha detectado en altas prevalencias en humanos con ITU y su presencia ha sido detectada en pacientes de cuidados intensivos en Uruguay (Lee *et al.* 2001; Yu *et al.* 2003; Kang *et al.* 2005; Cordeiro *et al.* 2008).

En este estudio también se detectó la presencia de los genes *qnrB-like* y *qnrS1* de PMQR por PCR y posterior confirmación por secuenciación. En particular, este trabajo consistió en el primer reporte en Uruguay de la presencia de gen *qnrS1* asociado a resistencias a quinolonas mediada por plásmidos. Las prevalencias de ambos genes PMQR fueron bajas, encontrándose un solo aislamiento *qnrS1* y 6 aislamientos *qnrB2-like* en los 112 aislamientos evaluados. No obstante de ello, las prevalencias fueron similares a las encontradas en Argentina y otras regiones del mundo, tanto en muestras clínicas (Corkill *et al.* 2005; Robicsek *et al.* 2006; Andres *et al.* 2013) como en muestras de origen animal (terneros y animales de compañía) (Kirchner *et al.* 2011; Guillard *et al.* 2015).

Otro mecanismo de resistencias estudiado fueron las BLEE. Respecto a la presencia de BLEE en la colección de *E. coli*, se determinó que sólo 3 aislamientos (21.3, 22.1A y 22.1B) entre los 112 aislamientos evaluados fueron productores de β -lactamasas de espectro extendido del grupo CTX-M-14 (test de sinergia y posterior identificación molecular de los genes *bla*). En Uruguay las BLEE que se han encontrado en mayor frecuencia son CTX-M-15, CTX-M-14, CTX-M-2, SHV-5 y SHV12 entre otras, y han sido descrita sólo en muestras clínicas humanas (Vignoli *et al.* 2005; 2006; Bado *et al.* 2010; Vignoli *et al.* 2016).

La resistencia a antibióticos ha sido reconocida por muchas décadas como uno de los grandes problemas de salud en el mundo, y es hoy uno de los retos que muchas organizaciones mundiales de la salud enfrentan (Marshall y Levy 2011). Recientemente la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) planteó esta temática en la 84ª Sesión General de su organización en París (Orand *et al.* 2016). En ella se reafirma la relevancia de la resistencia antimicrobiana en sanidad animal y salud humana y se reitera que la misma supone una amenaza para el control de las enfermedades infecciosas. En particular, la OIE forma parte de un plan de acción mundial junto con la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) sobre la resistencia a los antimicrobianos. El mencionado plan aboga por la concientización a nivel de todos los países respecto a la necesidad de crear marcos legislativos que puedan controlar el uso y comercialización de los antibióticos, así como en la realización de una colecta global de información, con el fin de generar programas de vigilancia que puedan dar seguimiento de las resistencias (Orand *et al.* 2016). Asimismo, este informe resalta la importancia de la formación de especialistas y de campañas de educación entre los veterinarios respecto

del uso adecuado de los antibióticos. Todas estas herramientas en su conjunto, permitirán combatir entonces las resistencias a los agentes antimicrobianos.

Respecto a la emergencia de resistencia a antibióticos en animales, el uso de los antibióticos como “promotores de crecimiento” sobresale como uno de los problemas más relevantes. Si bien esta práctica se encuentra prohibida en varios países, la metafilaxis continúa siendo aplicada como medida preventiva ante la sospecha de animales transcurriendo algún proceso infeccioso (Berge *et al.* 2006; Meganck *et al.* 2014). Asimismo, es importante resaltar que existen evidencias de transferencia de resistencia a antibióticos entre animales y los seres humanos. En estos casos se pueden mencionar estudios que han demostrado transferencia por contacto directo entre animales y el hombre así como a través de la cadena de producción de alimentos. Los primeros estudios que determinaron la ocurrencia de transferencia directa por contacto entre animales y el hombre fueron realizados por Levy y colaboradores (1976) y como éste, varios han demostrado principalmente la transferencia de bacterias resistentes entre animales y los productores y criadores en contacto diario y directo con los mismos (Van Den Bogaard *et al.* 2002; Aubry-Damon *et al.* 2004; Katsunuma *et al.* 2007). Por otro lado, existen extensas evidencias de la transferencia de resistencias entre distintas especies de animales y el hombre en las cadenas de producción de alimentos. En este caso se destaca la producción de carne en los frigoríficos con la concomitante contaminación de las carcasas con microorganismos presentes en el cuero y el contenido intestinal, así como en productos derivados del mar (Witte 1998; Lee 2003; Perreten 2005; Cabello 2006; Witte *et al.* 2007). Además, también se ha evidenciado la ocurrencia, directa o indirecta, de infecciones causadas por bacterias resistentes, las cuales se asocian al consumo de alimentos portadores de bacterias resistentes (Tacket *et al.* 1985). Por ejemplo, se ha reportado la ocurrencia de infecciones urinarias causadas por *E. coli* resistentes a gentamicina asociadas al consumo de alimentos contaminados con *E. coli* resistentes a ese antibiótico (Ho *et al.* 2010). Finalmente no es menor recordar que si bien todos estos estudios han demostrado la transferencia de resistencias a antibióticos presentes en animales hacia al hombre, muchos de éstos se han focalizado en microorganismos patógenos, que tienen la potencialidad de causar enfermedad. Mientras que las bacterias encontradas en el tracto gastrointestinal han sido foco de extensos estudios, por ejemplo los sistemas acuáticos (acuicultura, aguas residuales, aguas utilizadas para riego y recreación), que podrían funcionar como sitios de intercambio a través de transferencia horizontal de genes de resistencia entre bacterias presentes, han sido estudiados en menor medida (Marshall *et al.* 2009).

Los resultados de este capítulo confirman que la resistencia a antibióticos es un problema cada vez más relevante en la ganadería en Uruguay, situación que debería ser tomada en cuenta al momento de establecer estrategias de manejo y prevención de la DNT como de otras enfermedades infectocontagiosas. Además, se evidenció que existe una gran heterogeneidad genética entre los aislamientos de *E. coli* circulantes, así como aislamientos con potencialidad de causar enfermedad en otros bovinos. Los estudios de estructura poblacional encontraron nuevos ST de *E. coli* y otros previamente descritos por otros autores. Se destacó la detección de ST responsables de importantes brotes infecciosos en humanos por EHEC (ST21) ocurridos en EEUU y Europa, lo que revelaría el potencial zoonótico de los aislamientos de *E. coli* estudiados. En particular, desde un punto de vista epidemiológico el escenario de resistencias determinado en *E. coli* aisladas de heces de terneros podría jugar un rol importante en enfermedades en humanos causadas por estos microorganismos, favoreciendo la transmisión inter-especies

CAPÍTULO 3

Interacción bacteriana con el hospedero:
citotoxicidad, adhesión, expresión de adhesinas y
formación de *biofilms*

Introducción

Los microorganismos que forman parte de la microbiota intestinal así como los microorganismos patógenos se encuentran en continua interacción con el hospedero eucariota. Esta interacción está mediada por distintos factores que dependen del microorganismo y del hospedador así como de la etapa de interacción en la cual se encuentren. La adhesión de *E. coli* patogénica a las células epiteliales del intestino del hospedero constituye la primera etapa en el proceso de infección bacteriana y es considerada la base de la especificidad por el hospedero para muchos patógenos. Además de representar un blanco para el desarrollo de programas vacunales (Chen y Frankel 2005), se ha demostrado que las adhesinas dependen de la interacción con sus ligandos para mediar señales que pueden afectar la posterior internalización e invasión bacteriana así como las respuestas pro-inflamatorias del hospedador a través de interacciones con los receptores de la respuesta inmune innata (Kline *et al.* 2009).

La contribución de las adhesinas también ha sido ampliamente estudiada en las etapas de formación de *biofilms*. Estas estructuras son comunidades microbianas compuestas por células unidas irreversiblemente a un sustrato y embebidas en una matriz de polímeros extracelulares de producción propia (Donlan y Costerton 2002). La fisiología de los *biofilms* se caracteriza por un aumento de la tolerancia a estrés producido por situaciones adversas en el ambiente así como por la presencia de biocidas y las defensas producidas por la respuesta inmune del hospedador (Costerton 1995). Se ha reportado que esta forma de organización multicelular permite un mayor flujo de genes extra-cromosomales por conjugación entre los organismos presentes (Donlan 2002). La formación de los *biofilms* se puede clasificar básicamente en un proceso de 5 etapas, pudiéndose encontrar algunas diferencias particulares dependiendo de los requerimientos del microorganismo (O'Toole *et al.* 2000). Ellas son: I) aproximación y adhesión inicial reversible, II) adhesión robusta irreversible y producción de exopolisacárido, III) formación de microcolonias, IV) maduración y V) dispersión.

E. coli es uno de los microorganismos predominante en el tracto gastrointestinal donde para algunos autores, prospera un ambiente con *biofilms* de características multi-especies (Prober y Gibson 2002). Diversos estudios se han llevado a cabo con *E. coli* en la formación de *biofilms*, y en particular con los mecanismos moleculares asociados a las distintas etapas de su formación. Como se mencionó anteriormente en éste y en los capítulos anteriores, *E. coli* tiene la capacidad de expresar distintos tipos de adhesinas, característica que nos permite, en el caso de *E.*

coli patogénicas, diferenciar los diferentes patotipos (Kaper *et al.* 2004). En particular, se considera que estos organelos contribuirían en la etapa de adhesión irreversible al sustrato del *biofilm* (Beloin *et al.* 2008). Entre las adhesinas más estudiadas y cuyo rol en esta etapa de adhesión se encuentra ampliamente caracterizado están la fimbria Tipo 1 y la fimbria Curli (Vidal *et al.* 1998; Pratt y Kolter 1998; Cookson *et al.* 2002; Moreira *et al.* 2003; Orndorff *et al.* 2004; Uhlich *et al.* 2006). Asimismo, más recientemente, otras adhesinas auto-transportadoras como AIDA (proteína involucrada en adherencia difusa) y las proteínas Ag43 y TibA asociadas a *E. coli* diarreogénicas, han sido reconocidas como fuertes inductoras de la formación de *biofilms in vitro* (Danese *et al.* 2000; Sherlock *et al.* 2004; Sherlock *et al.* 2005).

Así como la adhesión y la colonización, la producción de toxinas constituye una etapa clave en el proceso de infección. En particular, la citotoxicidad de las toxinas tipo Shiga 1 y 2 de EHEC y STEC es foco de atención en numerosos estudios, principalmente por los efectos generados en infecciones en humanos. Como se mencionó anteriormente, la producción de Stx en pacientes infectados por STEC y EHEC usualmente puede desencadenar CH y SUH, ambas graves afecciones con importantes consecuencias en los individuos afectados (Tozzoli y Scheutz 2014). Asimismo, existen reportes de que los rumiantes, y en particular los terneros, no serían meramente reservorios de estos patotipos sino que también podrían ser afectados (Mainil y Fairbrother 2014).

Existen varias estrategias para abordar el estudio de estas toxinas. Por un lado la detección de los genes que las codifican resulta esencial. Pero además, una estrategia comúnmente utilizada es evaluar su actividad mediante la cuantificación del daño que generan en monocapas de células eucariotas (Angel Villegas *et al.* 2013; Fernández *et al.* 2013).

El objetivo de este capítulo consistió en evaluar las adhesinas de *E. coli* mediante ensayos de expresión *in vitro*, de adhesión en cultivos de células Hep-2 y de formación de *biofilms*. Asimismo, evaluar el efecto citotóxico de una selección de aislamientos de *E. coli* en cultivos de células VERO.

En los ensayos desarrollados en este Capítulo se empleó una selección de 20 aislamientos de *E. coli*. El criterio de selección de estos aislamientos se presentó y detalló en el capítulo anterior.

Resultados

Adhesión a células Hep-2

De acuerdo a los resultados de recuento en placa de las bacterias adheridas e internalizadas a las células Hep-2, los porcentajes de adhesión de los aislamientos de *E. coli* fueron muy variados. Los valores como se presentan en la Tabla 14 representan el promedio del porcentaje de adhesión de cada aislamiento en 2 pocillos diferentes de células eucariotas. Nueve aislamientos de *E. coli* (45 % de los evaluados) presentaron un porcentaje de adhesión menor al 10 % mientras que 11 aislamientos presentaron porcentajes de adhesión superiores al 30 % (Tabla 14). En particular 3 de los aislamientos evaluados presentaron un porcentaje de adhesión igual o superior al 80 %. Dichos aislamientos fueron 42.3 (100 %) 57.1 (80 %) y 74.1 (87 %). Por otro lado, los de menor porcentaje de adhesión fueron 21.1 (0,2 %), 74.3 (0,8 %), 56.1 (2,1 %) y 48.1 (2,6 %) (Tabla 14).

Tabla 14. Porcentaje de adhesión a monocapas de células Hep-2. Asterisco: aislamiento obtenido de necropsia. N° en rojo: porcentajes de adhesión menores al 10 %, n° en negro: porcentajes mayores al 80 %.

Departamento	Establecimiento	Aislamiento	Estado	Fecha	% Adhesión a monocapa
Colonia	2	6.2	E	2012	39,9
	3	21.1	E		0,2
	4	51.2	E		46,5
		52.3	E		5,8
	5	53 (*)	E		33,4
Florida	6	7.4	E	55,5	
		8.1	E	37,2	
San José	7	14.3	S	37,9	
	8	42.3	E	100	
	9	55.1	E	3,1	
		56.1	E	2,1	
Tacuarembó	10	28.1	E	37,8	
Soriano	11	48.1	E	2013	2,6
Canelones	13	36.4	S		6,0
	14	67.1	E	5,8	
Paysandú	16	57.1	S	80,0	
		59.1	S	6,5	
		64.2	E	5,9	
Artigas	17	74.1	E	2014	87,0
		74.3	E		0,8

Producción de *biofilms*

Cuantificación de los *biofilms* con la técnica de Cristal Violeta

Para evaluar la capacidad de los 20 aislamientos de formar *biofilms* en placas de poliestireno se utilizó la técnica semicuantitativa de Cristal Violeta previamente puesta a punto en nuestro laboratorio. Primeramente se realizaron cultivos bacterianos en placas de 96 pocillos. Transcurridas 48 hs de incubación, se tiñeron los *biofilms* con Cristal Violeta y se cuantificó su producción solubilizando el colorante de cada pocillo y midiendo absorbancia a 590 nm. Todos los aislamientos se sembraron por triplicado y los valores se presentaron como el promedio de ellos. Para la interpretación de los resultados se utilizó el criterio establecido y ampliamente utilizado en ensayos de cuantificación por Cristal Violeta de Angel Villegas y colaboradores en 2013 (descrito en materiales y métodos), y como control positivo la cepa uropatógena *P. mirabilis*

2921, ampliamente caracterizada en nuestro laboratorio y a la cual se le conoce su capacidad de fuerte formadora *biofilms* por este método y criterio de categorización.

La capacidad de formar *biofilms* de los aislamientos de *E. coli* estudiados fue variada. El 50 % de los aislamientos evaluados presentó una capacidad nula o débil de formar *biofilms*, como se puede observar en la figura 10 (aislamientos 8.1, 14.3, 21.1, 48.1, 55.1, 57.1, 59.1, 64.2, 67.1 y 74.3), mientras que un solo aislamiento presentó una capacidad moderada (36.4). Finalmente observamos que el 45 % de los aislamientos fueron fuertes formadores de *biofilms*. Estos aislamientos fueron 6.2, 7.4, 28.1, 42.3, 51.2, 52.3, 53, 56.1, 74.1) (Fig. 10). En particular, los aislamientos 56.1 y 52.3 que eran *f17A* positivos y que presentaban porcentajes de adhesión a células Hep-2 bajos (2,1 % y 5,8 % respectivamente) mostraron valores de absorbancia mayores al control positivo (Fig. 10).

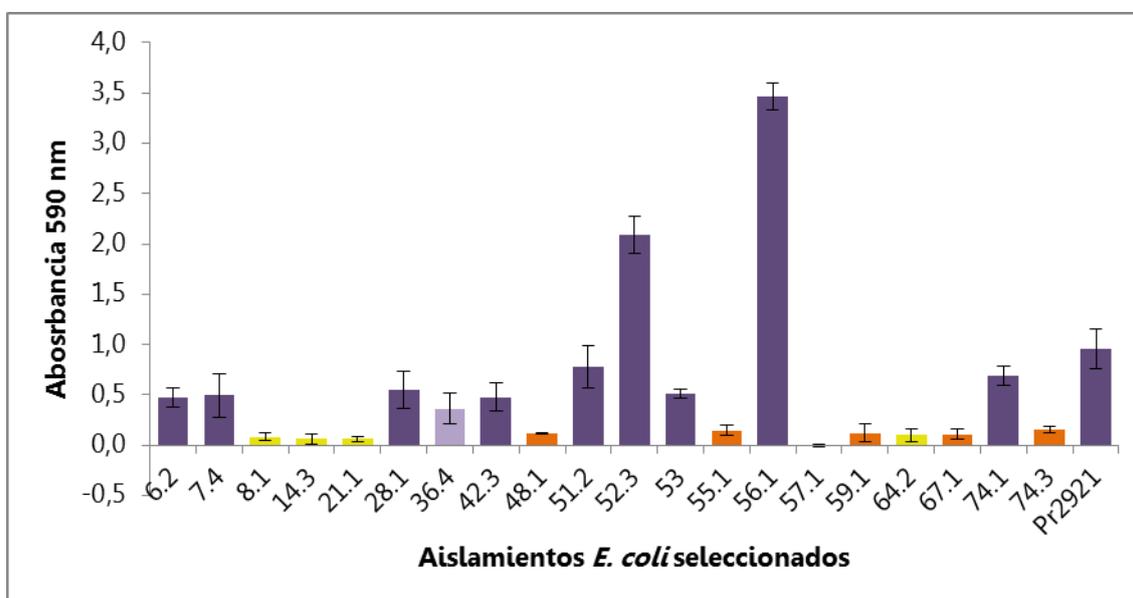


Figura 10. Cuantificación de la formación de *biofilms* de los aislamientos *E. coli* con la técnica semicuantitativa de CV. Promedio de los valores de absorbancia obtenidos para cada aislamiento. Amarillo: nulos formadores de *biofilms*. Naranja: débiles formadores de *biofilms*. Violeta claro y violeta oscuro: Moderado y Fuertes formadores de *biofilms* respectivamente. Control positivo: *P. mirabilis* 2921.

Bioarquitectura de los *biofilms* de *E. coli*

Con el fin de estudiar la arquitectura de los *biofilms* de *E. coli* se seleccionaron 2 aislamientos, previamente clasificados como altos formadores de *biofilms* en el ensayo con CV, para ser analizados mediante MLC. Para visualizar los ácidos nucleicos se utilizó el fluoróforo Syto80 en las condiciones descritas en materiales y métodos. Los aislamientos de *E. coli* seleccionados fueron 52.3 y 74.1.

Los modelos tridimensionales realizados con el *software* Sciansof (www.scian.cl) permitieron observar la formación de *biofilms in vitro* de los aislamientos 52.3 y 74.1 a los días 1, 3, 5 y 7 (Fig. 11A y 11B). En el caso del aislamiento 52.3, ya en el día 1 se pudieron observar algunos acúmulos bacterianos formados sobre el cubreobjetos, así como también se observaron en los días 3, 5 y 7 (Fig. 9A). Por otro lado, en los portaobjetos del aislamiento 74.1 las bacterias se encontraron generalmente aisladas, no observándose acúmulos en ninguno de los días ensayados (Fig. 11B).

Posteriormente, para cada aislamiento de *E. coli* se evaluó el número de bacterias y el volumen ocupado de cada campo y se compararon los resultados entre ellos. Cada parámetro se calculó a partir de los resultados obtenidos luego de la reconstrucción tridimensional. En estos análisis se calculó y representó el promedio de lo obtenido en cada uno de los 3 campos a los que se les realizó un *Z-stack*.

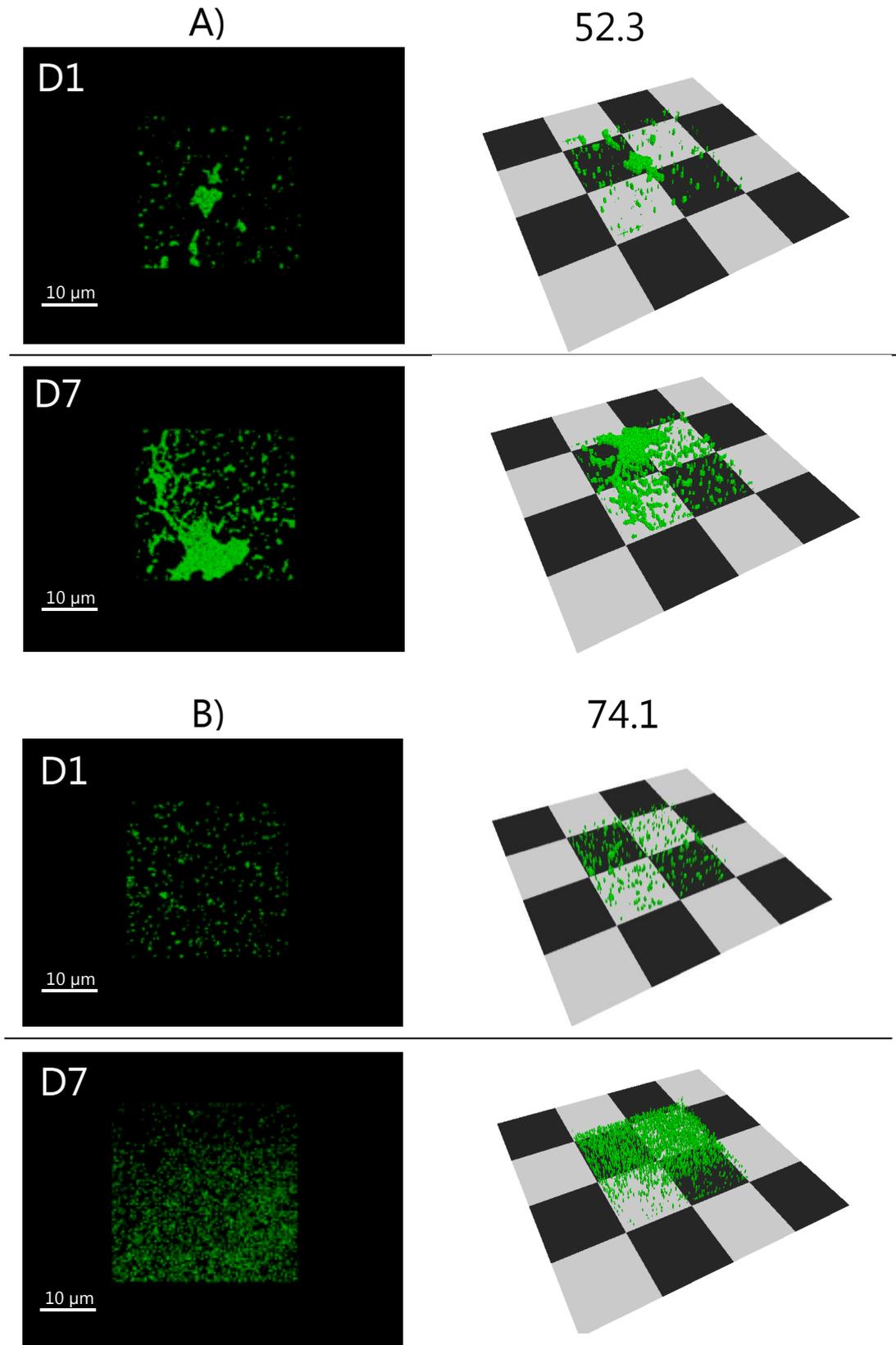


Figura 11. Modelos tridimensionales de los aislamientos 52.3 (A) y 74.1 (B) de *E. coli* a los días 1 y 7 generados con el *software* Sciansof (www.scian.cl). La marcación en verde corresponde a los ácidos nucleicos bacterianos marcados con el fluoróforo Syto80. Escala: 10 µm.

De acuerdo a los análisis de número de bacterias y volumen bacteriano se determinó que los aislamientos de *E. coli* estudiados presentaron fluctuaciones en ambos parámetros en los diferentes días que fueron evaluados (Fig. 9). Más aun, las diferencias observadas no fueron sólo respecto al transcurso de los días, sino que también se observaron diferencias en las cinéticas de formación de *biofilms* entre ellos. Como se observa en la figura 12A, el número de bacterias calculado para el aislamiento 52.3 a los días 1 y 3 fueron similares y a partir del días 5 aumentó hasta el 7 (círculos verdes). Lo mismo ocurrió con el volumen bacteriano calculado en cada campo (μm^3) para ese aislamiento (cuadrados violetas). Por otro lado, el aislamiento 74.1 presentó una cinética diferente. El número de bacterias en el día 1 fue aproximadamente 3 veces más elevado que el aislamiento de *E coli* 52.3 (círculos verdes) y aumentó levemente en el día 3 (Fig. 12B). Sin embargo, a diferencia del aislamiento 52.3 (que aumentó sostenidamente el número de bacterias con el transcurso de los días), el aislamiento 74.1 disminuyó el número de bacterias en el día 5 para finalmente aumentar en el día 7 (círculos verdes) (Fig. 12B).

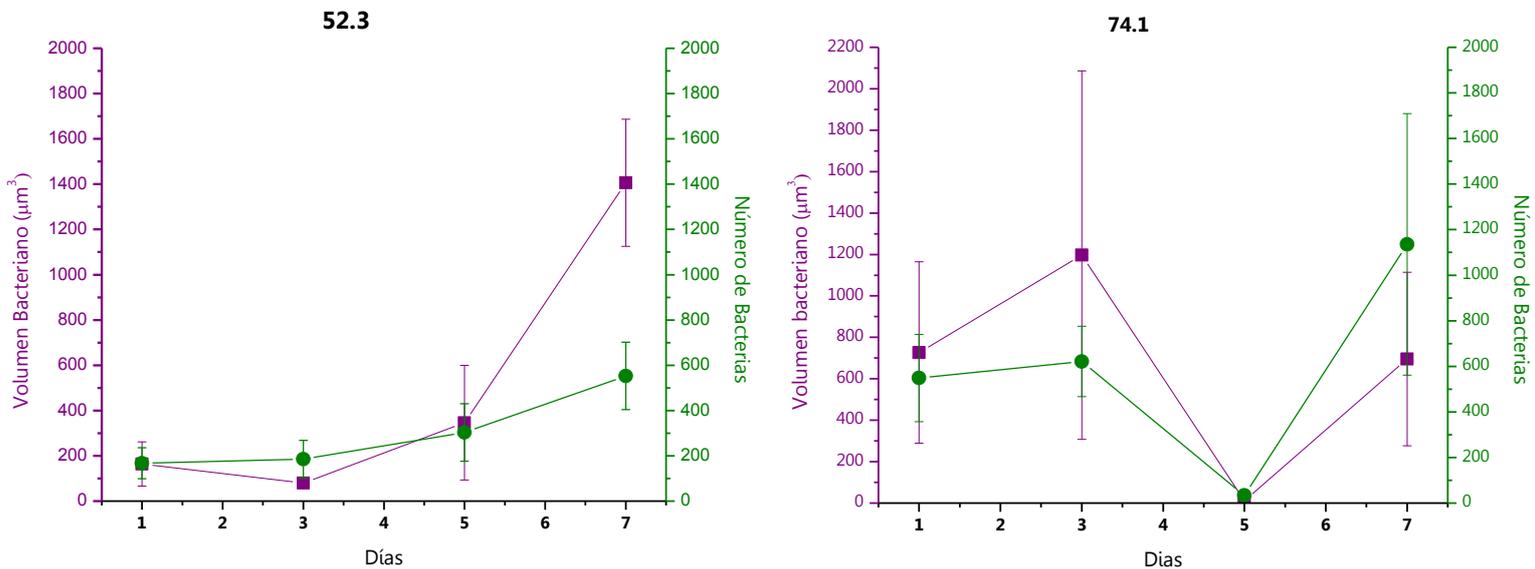


Figura 12. Gráficos número de bacterias-volumen bacteriano (μm^3) en función de los días analizados. Puntos verdes: número de bacterias. Cuadrados violetas: volumen bacteriano por campo (μm^3).

Expresión *in vitro* de ClpG

De acuerdo a los análisis de genes asociados a virulencia de *E. coli* desarrollados en el capítulo 1, uno de los genes cuya prevalencia fue elevada fue *clpG*, que codifica para la adhesina no fimbrial CS31A. En este sentido nos planteamos expresar de forma recombinante la proteína ClpG para utilizarla en futuros ensayos de expresión y serológicos en el laboratorio. La finalidad de esta estrategia sería la de desarrollar métodos diagnósticos de la adhesina CS31A en aislamientos de *E. coli* obtenidos de heces y necropsias de bovinos.

Amplificación del gen *clpG* de *E. coli*

Primeramente se desarrollaron y evaluaron los cebadores de expresión diseñados a partir de la secuencia completa del gen *clpG*, disponible en la base de datos del GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/145552>). Como se detalló en materiales y métodos al cebador ClpG-F se le incluyó un sitio de corte para la enzima de restricción *NdeI* y al cebador ClpG-R se le incorporó una cola de histidina luego del último codón codificante, seguida del sitio de corte para la enzima de restricción *HindIII* y un codón *stop*.

Una alícuota del producto de PCR se corrió en un gel de agarosa donde se corroboró la exitosa amplificación del gen, del tamaño esperado (Fig. 13).

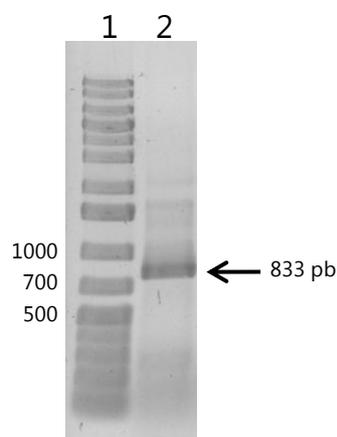


Figura 13. Gel de Agarosa 0.8 % teñido con GelRed. Carril 1: marcador 1kbPlus. Carril 2: gen *clpG* amplificado con los *primers* de expresión, tamaño del amplicón 833 pb (flecha).

A continuación, el producto de PCR se digirió con las enzimas de restricción y se clonó en el vector de expresión (plásmido pET21a(+)) previamente también digerido con las mismas enzimas. A continuación, la construcción se introdujo por transformación en la cepa *E. coli* XL-1 Blue. La selección de los transformantes se realizó en placas de medio LA/Amp 100 µg/ml. Para corroborar la presencia del inserto se realizó extracción de ADN plasmídico de uno de los clones, se digirió con las enzimas de restricción *NdeI* y *HindIII* y se analizó por electroforesis en gel de agarosa la presencia de un inserto del tamaño esperado. Finalmente, el plásmido de expresión se incorporó a la cepa de expresión *E. coli* BL21(ΔDE3) mediante transformación.

La cepa de expresión conteniendo al plásmido se almacenó por duplicado a -20°C y a -80°C en TSB-Glicerol 15%, adicionado con Ampicilina 100ug/ml para asegurar la permanencia del plásmido.

Expresión y purificación de ClpG-recombinante

La expresión de ClpG se realizó a partir de un caldo LB/Amp con una colonia aislada de la cepa de expresión *E. coli*-ClpG y adicionando IPTG 1mM final. La inducción de la expresión de ClpG se corroboró corriendo extractos de proteínas totales antes de la adición de IPTG (t0) y luego de la inducción (tf) en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (Fig. 14A). La proteína recombinante se encontró en la fracción insoluble de las células.

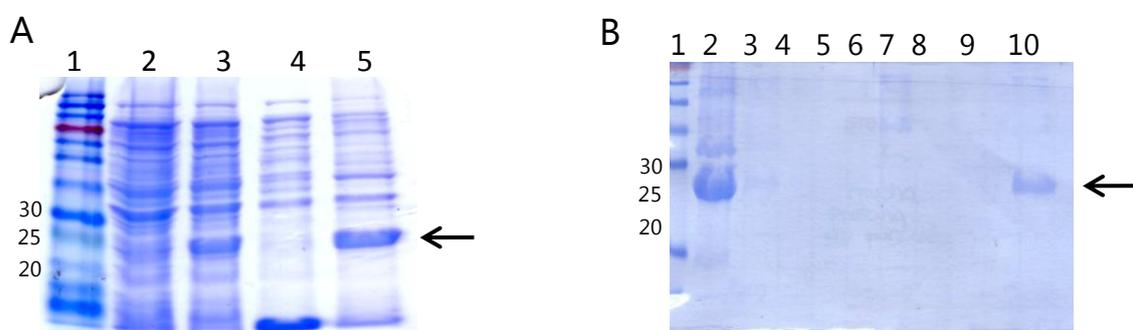


Figura 14. SDS-PAGE 15%. A: Inducción de la expresión de ClpG-recombinante. Carril 1: marcador de amplio rango, kDa (BioLabs). Carril 2: cultivo a tiempo 0. Carril 3: cultivo luego de la inducción con IPTG. Carril 4: fracción soluble del cultivo bacteriano. Carril 5: fracción insoluble del cultivo inducido con la proteína recombinante (flecha). B: Purificación de ClpG-recombinante. Carril 1: marcador. Carril 2: cuerpos de inclusión. Carriles 3-9: lavados de la columna de agarosa-niquel. Carril 10: ClpG-recombinante purificada luego de la adición de Imidazol al *buffer* (flecha).

La proteína recombinante se purificó en columnas de afinidad de Agarosa-Niquel en condiciones desnaturalizantes con urea 6M, las cuales retienen la proteína en su interior gracias a la presencia de una cola de histidina en el extremo N-terminal de la proteína. Para la elución de la proteína de la columna se utilizó Imidazol 500mM (Fig. 14B). La proteína ClpG-recombinante se dializó contra suero fisiológico durante 72hs a 4°C y se almacenó en alícuotas a -20°C hasta su uso.

Identidad de la proteína ClpG-recombinante

Para corroborar la identidad del inserto se extrajo el ADN plasmídico de la cepa de expresión *E. coli* BL21(λDE3) y se secuenció el fragmento de múltiple clonado del mismo en Macrogen (Corea). La secuencia obtenida mostró un porcentaje de similitud del 100 % con la secuencia del gen *clpG* de *E. coli* publicada (código de acceso en GenBank M55389.1) al emplear la herramienta bioinformática BLASTn.

Paralelamente, la identidad de la proteína se confirmó por MALDI-TOF (servicio de análisis de proteínas del IPMont). Estos análisis revelaron que en la muestra analizada se identificó de manera significativa una proteína hipotética de *E. coli*. Esta proteína no identificada de *E. coli* a su vez es similar a la proteína precursora de CS31A (GenBank: AAA23615.1). Link al *protein summary report* obtenido con el MASCOT: http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=.%2Fdata%2F20150908%2FFTTACzaee.dat&hit=gi%7C545157888&db_idx=1&px=1&ave_thresh=59&ignoreionsscorebelow=0&report=10&sigthreshhold=0.05&msresflags=1025&msresflags2=2&percolate=-1&percolate_rt=0&minpeplen=7&sessionID=guest_guestsession.

De esta manera, teniendo en cuenta la identidad de la secuencia del sitio de multi-clonado del plásmido de expresión y el análisis proteómico de la proteína purificada, se confirmó la identidad de nuestra proteína recombinante ClpG.

Evaluación de la expresión de ClpG en aislamientos de *E. coli*

La expresión *in vitro* de la proteína ClpG en los aislamientos de *E. coli* se evaluó en 5 aislamientos que fueron *clpG*⁺ (8.1, 48.1, 51.2, 59.1 y 64.2) y 3 aislamientos *clpG*⁻ (14.3, 52.3 y 74.1).

Se extrajeron las proteínas totales de cada una de las cepas seleccionadas, se separaron las mismas por SDS-PAGE (Fig. 15A) y luego se realizó un *Western blot* (Fig. 15B). Para la detección de la proteína ClpG se utilizaron los anticuerpos policlonales anti-ClpG de ratón generados por de la inmunización de ratones CD-1 con la proteína ClpG-recombinante.

Luego de la transferencia de las proteínas a la membrana de nitrocelulosa, el marcado con el anticuerpo anti-ClpG de ratón y el revelado se observó una respuesta muy tenue en todos los carriles (Fig. 15B). Independientemente de ellos, se reveló la proteína purificada (flechas) y una banda del mismo peso en los aislamientos 8.1, 51.2 y 64.2. Estos 3 aislamientos correspondieron a aislamientos *clpG*⁺. En ninguno de los otros carriles donde se sembraron extractos de proteínas totales de los aislamientos *clpG*⁺ positivos (48.1 y 59.1) y *clpG*⁻ negativos (14.3, 52.3 y 74.1) se observó una banda del peso de ClpG. Por otro lado, se observó la aparición de una banda de mayor peso en todos los extractos de proteínas totales, la cual no coincide con el tamaño esperado de la proteína purificada y se especula podría corresponder a otra proteína de similar identidad.

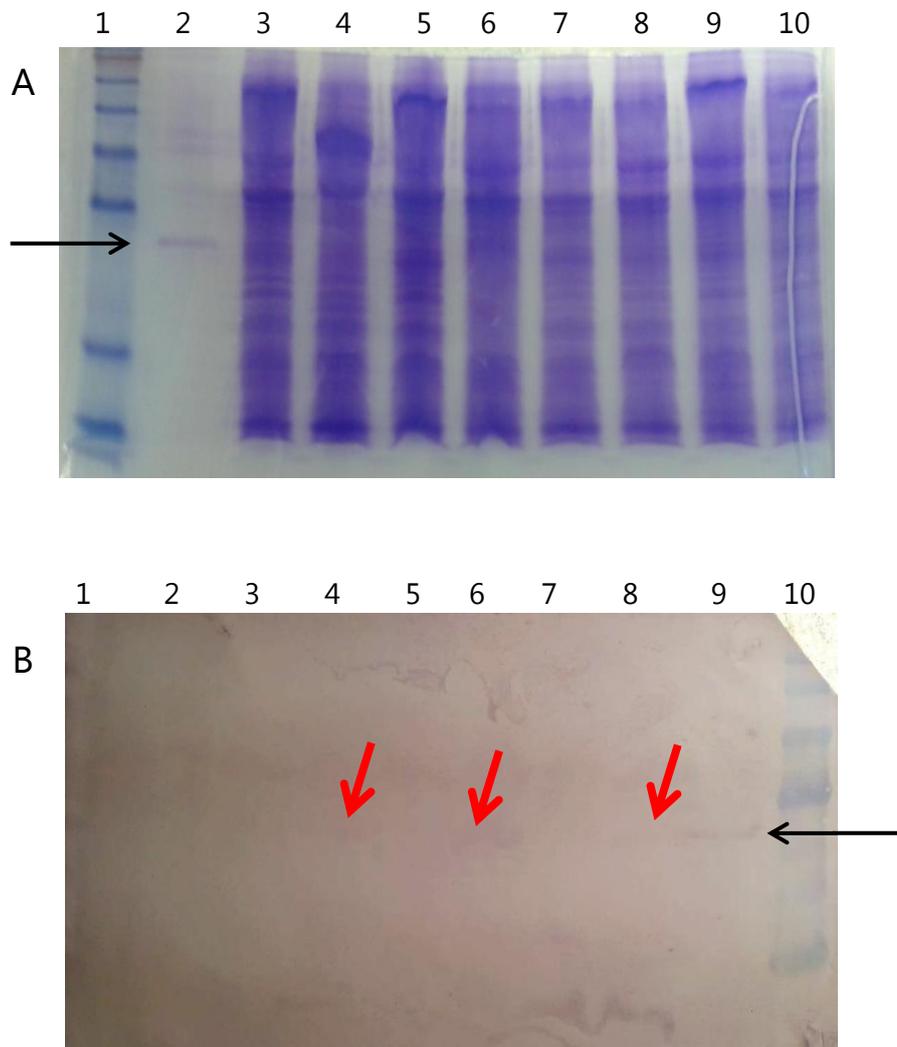


Figura 15. Expresión de ClpG en cultivos de *E. coli*. A: SDS-PAGE 15 %. Carril 1: marcador de amplio rango, kDa (BioLabs). Carril 2: proteína ClpG-recombinante purificada. Carriles 3-10: extractos de proteínas totales de los aislamientos 8.1, 48.1, 51.2, 59.1, 64.2, 14.3, 52.3 y 74.1 respectivamente. B: *Western blot*. Carril 10: marcador de amplio rango, kDa (BioLabs). Carril 9: proteína ClpG-recombinante purificada. Carriles 1-8: extractos de proteínas totales de los aislamientos 74.1, 52.3, 14.3, 64.2, 59.1, 51.2, 48.1 y 8.1 respectivamente. Flecha negra: ClpG-recombinante purificada. Flecha fucsia: proteína ClpG de *E. coli* expresada en los aislamientos 8.1, 51.2 y 64.2.

Efecto citotóxico en cultivos de células VERO

El efecto citotóxico de 20 aislamientos de *E. coli* se evaluó mediante la capacidad de los mismos de destruir monocapas de células VERO. Este ensayo fue realizado en colaboración con investigadores del Laboratorio de Inmunoquímica y Biotecnología de la UNCPBA en Tandil, quienes tienen vasta experiencia en la interpretación del daño a las monocapas. Todos los aislamientos se sembraron por duplicado. El criterio para evaluar el porcentaje de daño fue comparando los pocillos tratados con los pocillos con monocapas confluentes sin tratamiento. Como control positivo se utilizó una cepa citotóxica de *E. coli* ampliamente caracterizada en el Laboratorio de Inmunoquímica y Biotecnología de la UNCPBA, como se detalló en materiales y métodos.

Transcurridas 48 hs de incubación de los sobrenadantes bacterianos junto con las monocapas de células eucariotas se procedió a cuantificar la destrucción de la monocapa en cada pocillo. Sólo el aislamiento 74.1 (EHEC: *stx1+*, *eae+*) presentó un efecto citotóxico, el resto no mostró destrucción de las monocapas. Dicho aislamiento presentó un porcentaje de destrucción de la monocapa del 90 % respecto a los pocillos control, un porcentaje de destrucción incluso mayor que el control positivo (80 %) (Fig 16).

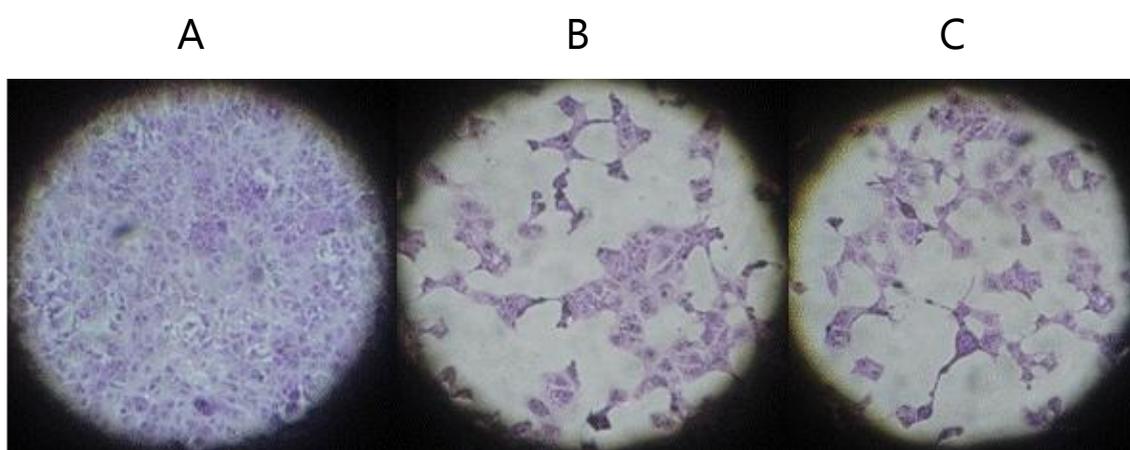


Figura 16. Ensayo de citotoxicidad en células VERO, 48 hs. Imágenes del pocillo control con monocapa intacta (A), control positivo con 80 % de destrucción (B) y aislamiento 74.1 con 90 % de destrucción de la monocapa (C) luego de 48 hs de incubación con los sobrenadantes de cada aislamiento de *E. coli*.

Discusión

La habilidad de los microorganismos como *E. coli* de adherirse y formar *biofilms* tiene importantes implicancias en el desarrollo de enfermedad así como en la persistencia en el hospedero cuando se trata de microorganismos patógenos. Asimismo, la interacción microorganismo-hospedero puede desencadenar efectos tóxicos para las células huésped. En esta sección se evaluaron las propiedades de adhesión, expresión de adhesinas, de formar *biofilms* y el efecto citotóxico de los aislamientos de *E. coli*.

A partir de los ensayos en cultivos de células Hep-2 se comprobó que los aislamientos de *E. coli* fueron capaces de adherirse a células eucariotas en cultivos, de forma variable entre aislamientos. Se determinó que 3 aislamientos presentaron un porcentaje de adhesión mayor al 80 %, habiendo sido caracterizados molecularmente dos de ellos en los patotipos ETEC (aislamiento 57.1, 80 % de adhesión a Hep-2) y EHEC (aislamiento 74.1, 87 % de adhesión a Hep-2). Por otro lado, 7 aislamientos presentaron un porcentaje de adhesión entre 30-55 % y 10 aislamientos (1/3 del total) presentaron un porcentaje de adhesión menor al 10 %. Los análisis de estos resultados no permitieron determinar ninguna asociación entre el porcentaje de adhesión a células Hep-2 y las características moleculares de los aislamientos, como por ejemplo la presencia de los genes que codifican para las adhesinas fimbriales y no fimbriales estudiadas. Estas observaciones demostrarían que las características de adhesión observadas no podrían ser explicadas solamente por la presencia de los genes que codifican para F5, F17 y CS31A. De la misma manera, la capacidad de formar *biofilms* de los aislamientos evaluada con la técnica semicuantitativa de Cristal Violeta fue variable. El 50 % de los aislamientos evaluados presentó una capacidad nula o débil de formar *biofilms*, un aislamiento presentó una capacidad moderada y el 45 % restante fueron fuertes formadores de *biofilms*. En particular se observó que aislamientos fuertes formadores de *biofilms* de acuerdo al ensayo de CV mostraron porcentajes de adhesión bajos (52.3, 56.1), intermedios (6.2, 7.4, 51.2 y 53) y altos (42.3 y 74.1) en células Hep-2; y que aislamientos no formadores de *biofilms* por CV (8.1, 14.3 y 57.1) presentaron porcentajes intermedios y altos de adhesión a cultivos de células eucariotas. Estos resultados demostrarían que los aislamientos de *E. coli* evaluados forman *biofilms* independientemente de las adhesinas involucradas en la adhesión a células eucariotas. Similares resultados fueron obtenidos recientemente por Culler y colaboradores (2014), quienes han demostrado que EPEC atípicas causantes de diarrea en humanos forman *biofilms* independientemente de la adhesión a células Hep-2. Por

otro lado, y si bien las técnicas de formación de *biofilms* por CV y adhesión bacteriana a células eucariotas no son equivalentes, trabajos previos han demostrado que ciertas adhesinas podrían participar en ambos procesos. Tal es el caso de la adhesina autotransportadora Ag43 de *E. coli*, la cual se ha visto que está involucrada en la formación de *biofilms* y tiene la capacidad de conferir adhesión a células Hep-2 en cultivo (Klemm y Schembri 2004). Como se mencionó anteriormente, se ha reportado que esta adhesina está presente en *E. coli* aisladas de terneros con diarreas (Danese *et al.* 2000; Sherlock *et al.* 2004; Sherlock *et al.* 2005) y constituye una proteína cuyo estudio sería muy importante evaluar en nuestra colección.

La bioarquitectura de los *biofilms* de *E. coli* sobre superficies abióticas también se evaluó por MLC. En este caso se estudió durante 7 días la dinámica de la formación de *biofilms* de 2 aislamientos, los cuales habían sido previamente caracterizados como fuertes formadores de *biofilms* por CV, pero presentaban perfiles moleculares bien diferentes. Se determinó que ambas cepas formaban *biofilms* sobre cubreobjetos de vidrio, pero con dinámicas diferentes. El aislamiento 52.3 (*f17A+*, *f17G(II)+*, 5,8 % de adhesión a Hep-2) mostró un aumento sostenido desde el día 1 hasta el 7, observándose los mayores *biofilms* a día 7. Por otro lado el aislamiento EHEC 74.1 (*ea+*, *stx1+*, 87 % de adhesión a células Hep-2) mostró una disminución en el volumen bacteriano al día 5, para luego aumentar en el día 7. En ambos casos los *biofilms* observados a tiempo final fueron mayores respecto a los días 1, 3 y 5.

Actualmente existen comercialmente disponibles varias vacunas para prevenir la DNT, principalmente dirigidas para evitar infecciones por ETEC. Estas vacunas buscan impedir la adhesión bacteriana al epitelio intestinal, etapa clave en el proceso infeccioso por ETEC (Nagy y Fekete 2005). Entre los antígenos bacterianos incluidos en las formulaciones se encuentra la fimbria F5, predominante en casos de diarreas. Sin embargo, tal y como lo proponen Kolenda y colaboradores (2015), se ha observado una disminución en la prevalencia de este antígeno en las últimas décadas, situación que se sospecha podría ser debida a una presión negativa generada por la vacunación con vacunas que la componen (Nagy y Fekete 1999). Como se demostró en el capítulo 1, la prevalencia del gen *f5* que codifica para la fimbria F5, fue el más bajo de todas las adhesinas evaluadas en nuestra colección, escenario que también se observó en Argentina (Picco *et al.* 2015). En nuestro trabajo se determinó que el gen *clpG*, que codifica para la adhesina CS31A fue uno de los más prevalentes junto con *f17A*. Si bien estos resultados ya han sido propuestos en otros estudios, ninguna de estas adhesinas ha sido incorporada a formulaciones comerciales hasta el momento. En este sentido y

teniendo en cuenta su alta prevalencia nos propusimos evaluar la expresión de la proteína ClpG *in vitro* así como su inmunogenicidad en un modelo animal de ratón. El uso de esta proteína como componente de vacunas contra DNT ya ha sido propuesto por otros autores, quienes la evalúan como transportadora de la enterotoxina ST de ETEC, de forma que la combinación de los antígenos aumente la respuesta de inmunoglobulinas anti-enterotoxina (Kuehni-boghenbor *et al.* 2012). Asimismo, la generación de la proteína ClpG recombinante nos interesaba desde un punto de vista biotecnológico ya que la misma podría emplearse para el desarrollo de métodos de detección de *E. coli* ClpG positivas en muestras de heces y necropsias de terneros, tales como ELISA o aglutinación.

En nuestro trabajo se logró purificar exitosamente la proteína ClpG-recombinante de *E. coli* utilizando un sistema de expresión procariota también de *E. coli*, y se indujo su expresión en condiciones desnaturalizantes *in vitro*. Además, la identidad de la proteína se corroboró por MALDI-TOF y secuenciación del sitio de multi-clonado en el plásmido de expresión pET-ClpG. Cuando se evaluó la expresión *in vitro* de la proteína se determinó que existe variabilidad entre los aislamientos de *E. coli*. Entre los aislamientos *clpG+* evaluados (n=5), sólo 3 develaron una banda correspondiente a la proteína ClpG-recombinante purificada por *Western blot* (aislamientos 8.1, 51.2 y 64.2). Estudios exhaustivos, en un mayor número de aislamientos, deberían realizarse para determinar la proporción de aislamientos *clpG+* que expresan ClpG en la colección. Paralelamente sería necesario incrementar la sensibilidad de la técnica de *Western blot*, así como mejorar el protocolo de inmunización en ratones y evaluar los epítopes de la proteína expresada. La intensidad de las bandas obtenidas en algunos casos fueron muy tenues, demostrando una respuesta menor a la previamente reportada por otros autores con CS31A recombinantes (Kuehni-boghenbor *et al.* 2012). Finalmente sería importante optimizar las condiciones de expresión de la adhesina CS31A de *E. coli*. Un nivel bajo de expresión de la proteína podría conducir a interpretaciones erróneas cuando se realizan ensayos de detección, por lo que la optimización de su expresión a escala de laboratorio o en reactores de escala industrial, en caso que se planeara incluirla en formulaciones vacunales, resulta fundamental.

CONCLUSIONES

Este estudio correspondió al primer trabajo a nivel nacional dirigido a identificar *E. coli* en heces de terneros afectados con DNT. Constituyó un trabajo que abordó la caracterización fenotípica, molecular, el estudio de las relaciones filogenéticas y las propiedades de adhesión y citotoxicidad de aislamientos de *E. coli* presentes en animales enfermos y sanos en distintos rodeos dedicados a la cría de bovinos.

Como se subrayó anteriormente, para poder desafiar el progreso de una enfermedad que afecta la salud animal e indirectamente la humana y que además presenta importantes implicancias económicas en el sector productivo en Uruguay, es imperioso conocer las características de los agentes etiológicos, las condiciones en la que se encuentran los animales en los establecimientos y las herramientas disponibles para contrarrestar sus efectos.

En este trabajo se determinó la presencia de *E. coli* en casos de DNT así como en terneros sin síntomas de DNT a partir de cultivos de heces en medios selectivos y posterior identificación bioquímica y molecular de los aislamientos. Se determinó que los genes que codifican las adhesinas CS31A y F17 fueron los más prevalentes, resultados coincidentes con los que se observa en países vecinos como Argentina y Brasil. De la misma manera, nuestros resultados corroboraron los obtenidos por investigadores en Argentina y otras partes del mundo, demostrando que los genes de virulencia y en particular los que codifican para la F17 y CS31A se encuentran tanto en animales enfermos como en animales sin síntomas de DNT. Además, se destacó la baja prevalencia de los genes que codifican para la fimbria F5, ampliamente caracterizada en casos de DNT en el mundo. Estudios recientes han demostrado que su prevalencia está disminuyendo desde hace 3 décadas, posiblemente debido a la vacunación por décadas de las hembras gestantes con vacunas conteniendo bacterinas de *E. coli* F5+, mientras que la prevalencia de *E. coli* F17+ permanece elevada. De la misma manera, la prevalencia de los genes que codifican a las toxinas tipo Shiga 1 y a las enterotoxinas termolábil y termoestable fueron también bajas, excepto para el gen *stx2*, el cual no se encontró en la colección de *E. coli*. Los resultados de prevalencias de genes de toxinas bajas ponen de manifiesto que los aislamientos de *E. coli* circulando en Uruguay presentan características de virulencia diferentes a los que se encuentran en la región. En Argentina, si bien la prevalencia de genes que codifican para la adhesina CS31A y la fimbria F17 son similares a los nuestros, la prevalencia de los patotipos STEC (*stx+*),

EHEC (*stx+*, *eae+*) y ETEC (*elt+*, *estA+*) en bovinos es mucho mayor a la determinada en nuestro trabajo.

La colección de aislamientos de *E. coli* presentó una alta heterogeneidad genética por ERIC-PCR, observándose que existen variantes genéticas circulando en los rodeos con potencial de causar enfermedad en animales sanos. Estos resultados, junto con las altas prevalencias de genes de virulencia en animales sin síntomas de DNT demostrarían que el estado sanitario de los animales y de los establecimientos, las normas de manejo, las condiciones ambientales y la co-infección con otros patógenos son factores de riesgo que podrían colaborar para el desencadenamiento de la enfermedad. Asimismo se evidenció que podría predominar una variante patogénica en una zona geográfica determinada en casos de DNT, como se observó en los establecimientos 14 y 15 en Canelones. De la misma manera, los análisis de MLST demostraron una alta heterogeneidad en la colección. Se identificaron 17 ST de *E. coli* diferentes en 22 aislamientos evaluados. Entre los 13 ST previamente descritos se encontraron secuenciotipos asociados a muestras de origen animal, ambientales y humanas, destacándose la ocurrencia de los complejos de secuenciotipo ST29 y ST69. Dichos complejos se han asociado a aislamientos de EHEC (ST29) y ExPEC (ST69) altamente virulentos en infecciones intestinales y extraintestinales y se encuentran ampliamente distribuidos en el mundo, asociados a enfermedad en humanos. Es importante destacar que 4 ST fueron clasificados como nuevos, lo que resalta la existencia de variantes genéticas únicas de *E. coli* circulando en nuestro país. Además, a estos nuevos ST se le añaden los 4 aislamientos cuya clasificación en ST están pendientes de determinar debido a que se encontraron nuevos alelos de los genes *adk* y *fumC*. Una vez asignados los nuevos alelos podremos confirmar que el 36 % de los aislamientos de *E. coli* (8 de 22) evaluados por MLST son nuevos.

La resistencia a antibióticos constituye uno de los grandes desafíos que enfrentan la OIE y la OMS actualmente. En las últimas décadas, el aumento en las resistencias a antibióticos debido al mal uso de los mismos y la emergencia de mecanismos de resistencias a antibióticos transferibles han dirigido el foco de muchos estudios a revertir esta situación. En nuestro trabajo, un elevado porcentaje de los aislamientos presentó multirresistencia a los antibióticos testeados, incluyendo entre ellos antibióticos comúnmente utilizados en la clínica veterinaria. En particular se destaca el alto porcentaje de aislamientos resistentes a enrofloxacina, antibiótico que se utiliza comúnmente para el tratamiento de diversas infecciones en bovinos y aves de

corral en Uruguay. Se determinó la presencia del Integrón de clase 1 portando casetes de genes que le confieren resistencia a aminoglicósidos y trimetropim (*dfrA7*, *dfrA17-aadA5*; *dfrA1-aadA1* y *dfrA12-orfF-aadA2*), algunos de los cuales han sido previamente descritos en muestras bovinas, de aves y en muestras clínicas de pacientes en cuidados intensivos en Uruguay. Respecto a las proteínas PMQR, se detectaron los genes *qnrB2-like* y *qnrS1*. La prevalencia de ambos genes no fue elevada (1 aislamiento *qnrS1+* y 6 aislamientos *qnrB2-like+*), pero revela la capacidad de los aislamientos de *E. coli* de bovinos de transferir resistencias a quinolonas entre bacterias. En particular, este trabajo consistió en el primer reporte del gen *qnrS1* en Uruguay. Paralelamente a la presencia de mecanismos de resistencia transferibles a quinolonas, se determinó que 3 aislamientos de *E. coli* fueron productores de β -lactamasas de espectro extendido del grupo CTX-M-14, lo que constituye el primer reporte de BLEE de ese grupo en *E. coli* de origen bovino en Uruguay. Acoplado los resultados de resistencias a antibióticos, presencia de mecanismos de resistencias transferibles y elementos genéticos móviles, junto con los resultados de MLST se confirma que están circulando aislamientos multiresistentes de *E. coli* de origen animal con potencial patogénico para el ser humano. El rol de los aislamientos de *E. coli* de bovinos como patógenos zoonóticos resalta la importancia de desarrollar acciones donde se inste al uso racionalizado de antibióticos así como de prevención de la DNT. Además, revela que si el uso de antibióticos continúa de forma desmedida, eventualmente el panel de antibióticos efectivos para el tratamiento de diversas infecciones en los animales puede perder efectividad.

La participación de las adhesinas fimbriales y no fimbriales de *E. coli* en las primeras etapas de adhesión bacteriana se evaluó en ensayos de adhesión a células epiteliales *in vitro* y en la formación de *biofilms* con CV y MLC. No se detectó una asociación entre la presencia de los genes que codifican para las adhesinas CS31A, F17 y F5 y ninguna de las propiedades evaluadas, aunque sí se observaron algunos aislamientos con altos porcentajes de adhesión a células epiteliales y aislamientos fuertes formadores de *biofilms*. Por ello, se especula que otros marcadores de virulencia de *E. coli* podrían ser los que nos permitan asociar las propiedades observadas en cada aislamiento. Respecto a la citotoxicidad *in vitro*, sólo el aislamiento 74.1 fue capaz de dañar células en cultivo. Estos resultados no fueron sorprendentes visto que ese aislamiento fue el único *stx1+* entre los estudiados en el ensayo de efecto citotóxico.

Respecto a la primera aproximación para el desarrollo de métodos diagnósticos de *E. coli*, en este trabajo pudimos expresar de forma recombinante la proteína ClpG de la adhesina no fimbrial CS31A. Dicha proteína recombinante fue exitosamente purificada de cuerpos de inclusión. Se determinó además la expresión *in vitro* de dicha proteína en medio TSA mediante *Western blot*, observándose una banda del tamaño esperado en 3 de 5 aislamientos *clpG+* evaluados. Si bien estos resultados fueron auspiciosos y demostraron la inmunogenicidad de ClpG, se deberá mejorar la sensibilidad del método así como evaluar otros medios y condiciones de cultivo en el laboratorio que favorezcan la expresión de dicha adhesina. La proteína ClpG recombinante generada en este trabajo constituye una herramienta para futuros estudios donde se pueda evaluar la potencialidad de la misma como componente de vacunas con DNT en *E. coli*, así como métodos diagnóstico de *E. coli* ClpG+. Si bien el gen que codifica para la adhesina CS31A fue uno de los más detectados en bovinos junto con los genes que codifican para la fimbria F7, actualmente ninguna de las vacunas para hembras gestantes comerciales disponibles contienen extractos proteicos de ellas, y su inclusión podría mejorar las respuestas de anticuerpos y la eficacia de las mismas.

PERSPECTIVAS

Los trabajos realizados en esta tesis permitieron sentar antecedentes respecto a la etiología de la DNT en Uruguay. Tanto de un punto de vista local como global, los resultados del presente proyecto generaron una contribución en el campo de la salud animal así como de la humana. Se ha establecido que las enfermedades infecciosas humanas son en su mayoría de origen animal, y que las pérdidas globales de producción debidas a enfermedades que afectan a los animales para el consumo, superan valores históricos. Como primer perspectiva sería interesante obtener un mayor conocimiento de la resistencia de *E. coli* a nivel veterinario, en estudios ampliados con mayor número de aislamientos. En este sentido, para que el tratamiento antibiótico empírico sea efectivo y no sobrevengán retrasos en la recuperación de los animales afectados es esencial contar con el conocimiento de la epidemiología y resistencia local. Por otro lado, como se mencionó anteriormente, es importante resaltar que los tratamientos antibióticos ejercen una presión de selección sobre microorganismos patógenos y con potencial zoonótico y sobre la microbiota gastrointestinal normal, situación que puede alcanzar al ser humano por distintas vías. Esta situación implicaría la movilización de nuevos mecanismos de resistencias que en consecuencia podrían afectar los tratamientos de otras enfermedades infectocontagiosas. Esto deja de manifiesto la esencialidad de conocer las bases moleculares de la resistencia local de los patógenos circulantes en bovinos. La detección de los mismos y su asociación a los clones circulantes generará información importante tanto en el área de la salud veterinaria como humana.

Paralelamente, será interesante poner a punto técnicas moleculares rápidas y sensibles, como PCR múltiples en tiempo real para la detección en simultáneo de varios de los genes de virulencia relevantes en DNT. Estas técnicas podrían luego utilizarse como insumo en el diagnóstico de laboratorio y permitirían tener herramientas para caracterizar rápidamente nuevos casos de DNT que puedan suceder, así como monitorear la evolución y características de los eventos de diarrea. En este sentido, sería muy interesante incluir en estos estudios algunos genes de virulencia asociados por ejemplo a los patotipos NTEC y DAEC, ya que como se discutió previamente se encuentran también asociados a DNT y no fueron estudiados en el presente trabajo.

Los ensayos de *biofilms* por MLC desarrollados en esta tesis permitieron determinar diferencias en la cinética y bioarquitectura de los *biofilms* de *E. coli* sobre superficies abióticas. No obstante de ello, sería interesante repetir los mismos, ampliando además el número de aislamientos a evaluar y los parámetros a estudiar.

La proteína ClpG recombinante generada en este trabajo constituyó el inicio en el proceso de creación de métodos dirigidos a la detección de *E. coli* CS31A+ en DNT. Para el desarrollo de una herramienta de diagnóstico basada en ClpG recombinante es esencial incrementar la sensibilidad de las técnicas de detección y la expresión de la misma. En este sentido buscaremos alternativas de medios de cultivo que favorezcan la expresión de ClpG y de otras adhesinas, así como evaluaremos la incorporación de modificaciones en el modelo de inmunización en ratón o el uso de otros modelos animales. Asimismo, sería clave establecer las condiciones de expresión a escala piloto en reactores industriales, con el fin de obtener grandes concentraciones de la proteína que permitan finalmente incorporarla a formulaciones vacunales.

Finalmente, es esencial continuar la difusión de los resultados obtenidos en este trabajo en el ámbito de la salud humana y animal en Uruguay. Para comenzar a generar cambios sustanciales en la epidemiología de *E. coli* en la DNT es importante la generación de conocimiento acerca de las características de esta bacteria circulante en los rodeos.

REFERENCIAS

- Ahmed AM, Motoi Y, Sato M, Maruyama A, Watanabe H, Fukumoto Y, Shimamoto T (2007) Zoo animals as reservoirs of Gram-negative bacteria harboring Integrons and antimicrobial resistance genes. *Applied and Environmental Microbiology* 73:6686-6690.
- Al Mawly J, Grinberg A, Prattley D, Moffat J, Marshall J, French N (2015) Risk factors for neonatal calf diarrhoea and enteropathogen shedding in New Zealand dairy farms. *Veterinary Journal* 203:155-160.
- Andrade GI, Coura FM, Santos ES, Ferreira MG, Galinari GCF, Facury Filho EJ, Carvalho AU, Lage AP, Heinemann MB (2012) Identification of virulence factors by multiplex PCR in *Escherichia coli* isolated from calves in Minas Gerais, Brazil. *Tropical Animal Health and Production* 44:1783-1790.
- Andres P, Lucero C, Soler-Bistué A, Guerriero L, Albornoz E, Tran T, Zorreguieta A, Galas M, Corso A, Tolmasky ME, Petroni A (2013) Genes in clinical enterobacteria with unusual phenotypes of quinolone susceptibility from Argentina. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 57:2467-2475.
- Angel Villegas N, Baronetti J, Albesa I, Polifroni R, Parma A, Etcheverría A, Becerra M, Padola N, Paraje M (2013) Relevance of biofilms in the pathogenesis of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* infection. *The Scientific World Journal* 2013:1-7.
- Antúnez K, Piccini C, Castro-Sowinski S, Rosado AS, Seldin L, Zunino P (2007) Phenotypic and genotypic characterization of *Paenibacillus larvae* isolates. *Veterinary Microbiology* 124:178-183.
- Ateba C, Mbewe M (2014) Genotypic characterization of *Escherichia coli* O157:H7 isolates from different sources in the north-west province, south Africa, using Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus PCR Analysis. *International Journal of Molecular Sciences* 15:9735-9747.
- Aubry-Damon H, Grenet K, Sall-Ndiaye P, Che D, Cordeiro E, Bougnoux M-E, Rigaud E, Le Strat Y, Lemanissier V, Armand-Lefèvre L, Delzescaux D, Desenclos J-C, Liénard M, Andremont A (2004) Antimicrobial resistance in commensal flora of pig

- farmers. *Emerging Infectious Diseases* 10:873-879.
- Bado I, Cordeiro NF, Robino L, García-Fulgueiras V, Seija V, Bazet C, Gutkind G, Ayala JA, Vignoli R (2010) Detection of class 1 and 2 integrons, extended-spectrum B-lactamases and qnr alleles in enterobacterial isolates from the digestive tract of Intensive care Unit inpatients. *International Journal of Antimicrobial Agents* 36:453-458.
- Bado I, Gutiérrez C, García-Fulgueiras V, Cordeiro NF, Araújo Pirez L, Seija V, Bazet C, Rieppi G, Vignoli R (2016) CTX-M-15 in combination with *aac(6)/lb-cr* are the most prevalent mechanism of resistance between both *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* including ST258 in an ICU from Uruguay. *Journal of Global Antimicrobial Resistance* 6:5-9.
- Bae I, Kim J, Hannah Sun J, Jeong S, Kim Y, Wang K, Lee K (2014) Comparison of pulsed-field gel electrophoresis & repetitive sequence-based PCR methods for molecular epidemiological studies of *Escherichia coli* clinical isolates. *Indian Journal of Medical Research* 140:679-685.
- Bardiau M, Szalo M, Mainil JG (2010) Initial adherence of EPEC, EHEC and VTEC to host cells. *Veterinary Research* 41:41-57.
- Barlow RS, Fegan N, Gobius KS (2009) Integron-containing bacteria in faeces of cattle from different production systems at slaughter. *Journal of Applied Microbiology* 107:540-545.
- Bartels CJM, Holzhauer M, Jorritsma R, Swart WAJM, Lam TJGM (2010) Prevalence, prediction and risk factors of enteropathogens in normal and non-normal faeces of young Dutch dairy calves. *Preventive Veterinary Medicine* 93:162-169.
- Batchelor M, Knutton S, Caprioli A, Huter V, Zaniál M, Dougan G, Frankel G (1999) Development of a universal intimin antiserum and PCR primers. *Journal of Clinical Microbiology* 37:3822-3827.
- Bellinzoni R, Blackhall J, Terzolo H, Moreira A, Auza N, Mattion, N. Micheo G, La Torre J, Scodeller E (1990) Microbiology of diarrhoea in young beef and dairy calves in Argentina. *Revista Argentina de Microbiología* 22:130-136.
- Beloin C, Roux A, Ghigo JM (2008) *Escherichia coli* biofilms. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 322:249-289.

- Berchtold J (2009) Treatment of Calf Diarrhea: Intravenous fluid therapy. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 25:73-99.
- Berge ACB, Besser TE, Moore DA, Sisco WM (2009) Evaluation of the effects of oral colostrum supplementation during the first fourteen days on the health and performance of preweaned calves. *Journal of Dairy Science* 92:286-295.
- Berge ACB, Moore DA, Sisco WM (2006) Field trial evaluating the influence of prophylactic and therapeutic antimicrobial administration on antimicrobial resistance of fecal *Escherichia coli* in dairy calves. *Applied and Environmental Microbiology* 72:3872-3878.
- Bertin A (1998) Phenotypic expression of K88 adhesin alone or simultaneously with K99 and/or F41 adhesins in the bovine enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Veterinary Microbiology* 59:283-294.
- Bertin Y, Girardeau JP, Darfeuille-Michaud A, Contrepolis M (1996a) Characterization of 20K fimbria, a new adhesin of septicemic and diarrhea-associated *Escherichia coli* strains, that belongs to a family of adhesins with N-acetyl-D-glucosamine recognition. *Infection and Immunity* 64:332-42.
- Bertin Y, Martin C, Girardeau JP, Pohl P, Contrepolis M (1998) Association of genes encoding P fimbriae, CS31A antigen and EAST 1 toxin among CNF1-producing *Escherichia coli* strains from cattle with septicemia and diarrhea. *FEMS microbiology letters* 162:235-239.
- Bertin Y, Martin C, Oswald E, Girardeau JP (1996b) Rapid and specific detection of F17-related pilin and adhesin genes in diarrheic and septicemic *Escherichia coli* strains by multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 34:2921-2928.
- Bielaszewska M, Idelevich EA, Zhang W, Bauwens A, Schaumburg F, Mellmann A, Peters G, Karch H (2012) Effects of antibiotics on Shiga toxin 2 production and bacteriophage induction by epidemic *Escherichia coli* O104:H4 strain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 56:3277-3282.
- Bielaszewska M, Mellmann A, Bletz S, Zhang W, Kock R, Kossow A, Prager R, Fruth A, Orth-Holler D, Marejková M, Morabito S, Caprioli A, Piérard D, Smith G, Jenkins C, Curová K, Karch H (2013) Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26:H11/H-: A New virulent clone emerges in Europe. *Clinical Infectious Diseases* 56:1373-1381.

- Blanco M, Padola NL, Krüger A, Sanz ME, Blanco JJE, González EA, Dahbi G, Mora A, Bernárdez MI, Etcheverría AI, Arroyo GH, Lucchesi PMA, Parma AE, Blanco JJE, (2004) Virulence genes and intimin types of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle and beef products in Argentina. *International Microbiology* 7:269-276.
- Bousquet F, Martin C, Girardeau JP, Mechin MC, Der Vartanian M, Laude H, Contrepolis M (1994) CS31A capsule-like antigen as an exposure vector for heterologous antigenic determinants. *Infection Immunity* 62:2553-2561.
- Bullock W, Fernández JM, Short J. (1987) XL1-Blue, high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with b-galactosidase section. *Biotechniques* 5:376-379.
- Byappanahalli MN, Whitman RL, Shively DA, Ferguson J, Ishii S, Sadowsky MJ (2007) Population structure of Cladophora-borne *Escherichia coli* in nearshore water of Lake Michigan. *Water Research* 41:3649-3654.
- Cabello FC (2006) Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: A growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental Microbiology* 8:1137-1144.
- Cantón R, Coque TM (2006) The CTX-M β -lactamase pandemic. *Current Opinion in Microbiology* 9:466-475.
- Caprioli A, Morabito S, Brügere H, Oswald E (2005) Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. *Veterinary Research* 36:289-311.
- Cebula TA, Payne WL, Feng P (1995) Simultaneous identification of strains of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and their Shiga-like toxin type by mismatch amplification mutation assay-multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 33:248-250.
- Chandran A, Mazumder A (2014) Occurrence of diarrheagenic virulence genes and genetic diversity in *Escherichia coli* isolates from fecal material of various avian hosts in British Columbia, Canada. *Applied and Environmental Microbiology* 80:1933-1940.
- Chase-Topping ME, Rosser T, Allison LJ, Courcier E, Evans J, McKendrick IJ, Pearce MC, Handel I, Caprioli A, Karch H, Hanson MF, Pollock KGJ, Locking ME, Woolhouse

- MEJ, Matthews L, Low JC, Gally DL (2012) Pathogenic potential to humans of bovine *Escherichia coli* O26, Scotland. *Emerging Infectious Diseases* 18:439-448.
- Chaudhuri RR, Henderson IR (2012) The evolution of the *Escherichia coli* phylogeny. *Infection, Genetics and Evolution* 12:214-226.
- Chen HD, Frankel G (2005) Enteropathogenic *Escherichia coli*: unravelling pathogenesis. *FEMS Microbiology Reviews* 29:83-98.
- Chen X, Zhang W, Pan W, Yin J, Pan Z, Gao S, Jiao X (2012) Prevalence of *qnr*, *aac(6')-Ib-cr*, *qepA*, and *oqxAB* in *Escherichia coli* isolates from humans, animals, and the environment. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 56:3423-3427.
- Cho Y Il, Yoon KJ (2014) An overview of calf diarrhea - infectious etiology, diagnosis, and intervention. *Journal of Veterinary Science* 15:1-17.
- Clermont O, Olier M, Hoede C, Diancourt L, Brisse S, Keroudean M, Glodt J, Picard B, Oswald E, Denamur E (2011) Animal and human pathogenic *Escherichia coli* strains share common genetic backgrounds. *Infection, Genetics and Evolution* 11:654-662.
- Constable PD (2004) Antimicrobial use in the treatment of calf diarrhea. *Journal of Veterinary Internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine* 18:8-17.
- Contrepois M, Bertin Y, Pohl P, Picard B, Girardeau JP (1998) A study of relationships among F17 a producing enterotoxigenic and non-enterotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic calves. *Veterinary Microbiology* 64:75-81.
- Cookson AL, Cooley WA, Woodward MJ (2002) The role of type 1 and curli fimbriae of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in adherence to abiotic surfaces. *International Journal of Medical Microbiology* 292:195-205.
- Cordeiro NF, Robino L, Medina J, Seija V, Bado I, García-Fulgueiras V, Berro M, Pontet J, López L, Bazet C, Rieppi G, Gutkind G, Ayala JA, Vignoli R (2008) Ciprofloxacin-resistant enterobacteria harboring the *aac(6')-Ib-cr* variant isolated from feces of inpatients in an intensive care unit in Uruguay. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52:806-807.
- Corkill JE, Anson JJ, Hart CA (2005) High prevalence of the plasmid-mediated quinolone resistance determinant *qnrA* in multidrug-resistant *Enterobacteriaceae* from blood

- cultures in Liverpool, UK. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 56:1115-1117.
- Cortese VS (2009) Neonatal Immunology. *Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice* 25:221-227.
- Costerton JW (1995) Overview of microbial biofilms. *Journal of Industrial Microbiology* 15:137-140.
- Cox E, Melkebeek V, Devriendt B, Goddeeris BM, Vanrompay D (2014) Vaccines against enteric *Escherichia coli* infections in animals. En: Morabito S (ed) *Pathogenic Escherichia coli. Molecular and Cellular Microbiology*. Caister Academic Press, Norfolk, pp 255-271.
- Croxen MA, Finlay BB (2010) Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nature Reviews Microbiology* 8:26-38.
- Culler HF, Mota CM, Abe CM, Elias WP, Sircili MP, Franzolin MR (2014) Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains form biofilm on abiotic surfaces regardless of their adherence pattern on cultured epithelial cells. *BioMed Research International* 10-15.
- Da Silveira WD, Ferreira A, Lancellotti M, Barbosa IAGCD, Leite DS, de Castro AFP, Brocchi M (2002) Clonal relationships among avian *Escherichia coli* isolates determined by enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC)-PCR. *Veterinary Microbiology* 89:323-328.
- Danese PN, Pratt LA, Dove SL, Kolter R (2000) The outer membrane protein, Antigen 43, mediates cell-to-cell interactions within *Escherichia coli* biofilms. *Molecular Microbiology* 37:424-432.
- De Rycke J, Milon A, Oswald E (1999) Necrotoxic *Escherichia coli* (NTEC): Two emerging categories of human and animal pathogens. *Veterinary Research* 30:221-233.
- Dean-Nystrom EA, Bosworth BT, Moon HW, O'Brien AD (1998) *Escherichia coli* O157:H7 requires intimin for enteropathogenicity in calves. *Infection and Immunity* 66:4560-4563.
- Di Conza JA, Gutkind GO (2010) Integrones: los coleccionistas de genes. *Revista Argentina de Microbiología* 42:63-78.
- Dirección del Área de Estadísticas Agropecuarias (2015) Anuario Estadístico

Agropecuário del Uruguay. Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, Montevideo

Donlan RM (2002) Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases* 8:881-890.

Donlan RM, Costerton JW (2002) Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology* 15:167-193.

Duffy G, McCabe E (2015) Veterinary public health approach to managing pathogenic verocytotoxigenic *Escherichia coli* in the agri-food chain. En: Sperandio V, Hovde CJ (eds) Enterohemorrhagic *Escherichia coli* and other shiga toxin-producing *E. coli*. ASM Press, Dallas, pp 457-485.

Ebner P, Garner K, Mathew A (2004) Class 1 integrons in various *Salmonella enterica* serovars isolated from animals and identification of genomic island SGI1 in *Salmonella enterica* var. Meleagridis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 53:1004-1009.

Endtz HP, Ruijs GJ, van Klingeren B, Jansen WH, van der Reyden T, Mouton RP (1991) Quinolone resistance in campylobacter isolated from man and poultry following the introduction of fluoroquinolones in veterinary medicine. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 27:199-208.

Etcheverría AI, Arroyo GH, Alzola R, Parma AE (2011) Reduction of adherence of *E. coli* O157:H7 to HEp-2 Cells and to bovine large intestinal mucosal explants by colicinogenic *E. coli*. *ISRN Microbiology* 2011:1-5.

Fernández D, Krüger A, Polifroni R, Bustamante A V, Sanso AM, Etcheverría AI, Lucchesi PM, Parma AE, Padola NL (2013) Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O130:H11 and O178:H19 isolated from dairy cows. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 3:1-9.

Foley SL, Lynne AM, Nayak R (2009) Molecular typing methodologies for microbial source tracking and epidemiological investigations of Gram-negative bacterial foodborne pathogens. *Infection, Genetics and Evolution* 9:430-440.

Foster DM, Smith GW (2009) Pathophysiology of Diarrhea in Calves. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice* 25:13-36.

Franck SM, Bosworth BT, Moon HW (1998) Multiplex PCR for enterotoxigenic, attaching

- and effacing, and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from calves. *Journal of Clinical Microbiology* 36:1795-1797.
- Geue L, Klare S, Schnick C, Mintel B, Meyer K, Conraths FJ (2009) Analysis of the clonal relationship of serotype O26:H11 enterohemorrhagic *Escherichia coli* isolates from cattle. *Applied and Environmental Microbiology* 75:6947-6953.
- Ghanbarpour R, Oswald E (2008) Characteristics and virulence genes of *Escherichia coli* isolated from septicemic calves in southeast of Iran. *Tropical Animal Health and Production* 41:1091-1099.
- Ghanbarpour R, Oswald E (2010) Phylogenetic distribution of virulence genes in *Escherichia coli* isolated from bovine mastitis in Iran. *Research in Veterinary Science* 88:6-10.
- Guillard T, de Jong A, Limelette A, Lebreil AL, Madoux J, de Champs C (2015) Characterization of quinolone resistance mechanisms in Enterobacteriaceae recovered from diseased companion animals in Europe. *Veterinary Microbiology* 30102-30104.
- Guth BEC, Prado V, Rivas M (2010) Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. En: Carvioto A (ed) *Pathogenic Escherichia coli in Latin America*. pp 65-83.
- Gyles CL (2007) Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. *Journal of Animal Science* 85:E45-62.
- Gyles JM, Fairbrother CL (2010) *Escherichia coli*. En: Gyles CL, Prescott JF, Songer JG, Thoen CO (eds) *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals*. pp 276-308.
- Hancock D, Besser T, LeJeune J, Davis M, Rice D (2001) The control of VTEC in the animal reservoir. *International Journal of Food Microbiology* 66:71-78.
- Hernández RT, Velsko I, Sampaio SCF, Elias WP, Robins-Browne RM, Gomes TAT, Girón JA (2011) Fimbrial adhesins produced by atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains. *Applied and Environmental Microbiology* 77:8391-8399.
- Higgins LM, Frankel G, Connerton I, Gonçalves NS, Dougan G, MacDonald TT (1999) Role of bacterial intimin in colonic hyperplasia and inflammation. *Science* 285:588-591.
- Ho P-L, Wong RC, Lo SW, Chow K-H, Wong SS, Que T-L (2010) Genetic identity of

- aminoglycoside-resistance genes in *Escherichia coli* isolates from human and animal sources. *Journal of Medical Microbiology* 59:702-707.
- Johnson TJ, Wannemuehler Y, Johnson SJ, Stell AL, Doetkott C, Johnson JR, Kim KS, Spanjaard L, Nolan LK (2008) Comparison of Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains from human and avian sources reveals a mixed subset representing potential zoonotic pathogens. *Applied and Environmental Microbiology* 74:7043-7050.
- Jones NL, Islur A, Haq R, Mascarenhas M, Karmali MA, Perdue MH, Zanke BW, Sherman PM (2000) *Escherichia coli* Shiga toxins induce apoptosis in epithelial cells that is regulated by the Bcl-2 family. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 278:811-819.
- Kang HY, Jeong YS, Oh JY, Tae SH, Choi CH, Moon DC, Lee WK, Lee YC, Seol SY, Cho DT, Lee JC (2005) Characterization of antimicrobial resistance and class 1 integrons found in *Escherichia coli* isolates from humans and animals in Korea. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 55:639-644.
- Kaper JB, Nataro JP, Mobley HLT (2004) Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology* 2:123-140.
- Karczmarczyk M, Walsh C, Slowey R, Leonard N, Fanning S (2011) Molecular characterization of multidrug-resistant *Escherichia coli* isolates from Irish cattle farms. *Applied and Environmental Microbiology* 77:7121-7127.
- Katsunuma Y, Hanazumi M, Fujisaki H, Minato H, Hashimoto Y, Yonemochi C (2007) Associations between the use of antimicrobial agents for growth promotion and the occurrence of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* and enterococci in the feces of livestock and livestock farmers in Japan. *The Journal of General and Applied Microbiology* 53:273-279.
- Kehoe SI, Jayarao BM, Heinrichs AJ (2007) A survey of bovine colostrum composition and colostrum management practices on Pennsylvania dairy farms. *Journal of Dairy Science* 90:4108-4116.
- Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular evolution* 16:111-120.

- Kirchner M, Wearing H, Teale C (2011) Plasmid-mediated quinolone resistance gene detected in *Escherichia coli* from cattle. *Veterinary Microbiology* 148:434-435.
- Kirisawa R, Takeyama AI, Koiwa M, Iwai H (2007) Detection of bovine Torovirus in fecal specimens of calves with diarrhea in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science* 69:471-476.
- Klemm P, Schembri M (2004) Type 1 fimbriae, curli, and antigen 43: adhesion, colonization, and biofilm formation. *EcoSal Plus* 1:ecosalplus 8.3.2.6.
- Kline KA, Fälker S, Dahlberg S, Normark S, Henriques-Normark B (2009) Bacterial adhesins in host-microbe interactions. *Cell Host & Microbe* 5:580-592.
- Kolenda R, Burdukiewicz M, Schierack P (2015) A systematic review and meta-analysis of the epidemiology of pathogenic *Escherichia coli* of calves and the role of calves as reservoirs for human pathogenic *E. coli*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 5:1-12.
- Konowalchuk J, Speirs JI, Stavric S (1977) Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* 18:775-779.
- Kuehni-Boghenbor K, Jordi HA, Frey J, Vilei EM, Favre D, Stoffel MH (2012) Expression and morphology of enterotoxigenic *Escherichia coli* surface antigen CS31A in *E. coli* K12 and *Vibrio cholerae*. *Canadian Journal of Microbiology* 58:728-737.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of Structural Proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Lee JC, Oh JY, Cho JW, Park JC, Kim JM, Seol SY, Cho DT (2001) The prevalence of trimethoprim-resistance-conferring dihydrofolate reductase genes in urinary isolates of *Escherichia coli* in Korea. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 47:599-604.
- Lee JH (2003) Methicillin (oxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from major food animals and their potential transmission to humans. *Applied and Environmental Microbiology* 69:6489-6494.
- Levy SB, Fitzgerald GB, Maccone AB (1976) Spread of antibiotic-resistant plasmids from chicken to chicken and from chicken to man. *Nature* 260:40-42.
- Liu BT, Liao XP, Yue L, Chen XY, Li L, Yang SS, Sun J, Zhang S, Liao SD, Liu YH (2013) β -

- lactamase, Prevalence of Isolates, and 16S rRNA methylase genes among clinical *Escherichia coli* carrying plasmid-mediated quinolone resistance genes from animals. *Microbial Drug Resistance* 19:237-245.
- Lorenz I, Fagan J, More SJ (2011) Calf health from birth to weaning. II. Management of diarrhoea in pre-weaned calves. *Irish Veterinary Journal* 64:1-9.
- Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, Zhang Q, Zhou J, Zurth K, Caugant DA, Feavers IM, Achtman M, Spratt BG (1998) Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:3140-3145.
- Mainil JG (2013) *Escherichia coli* virulence factors. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 152:2-12.
- Mainil JG, Fairbrother J (2014) Pathogenic *Escherichia coli* in domestic mammals and birds. En: Morabito S (ed) *Pathogenic Escherichia coli*. *Molecular and Cellular Microbiology*, UK, pp 19-44.
- Marcé C, Guatteo R, Bareille N, Fourichon C (2010) Dairy calf housing systems across Europe and risk for calf infectious diseases. *Animal* 4:1588-1596.
- Margueritte J, Mattion N, Blackhall J (2005) Diarrea neonatal en terneros de rodeos de cría: su prevención y tratamiento. *Sitio Argentino de Producción Animal* 1:11-13.
- Marshall BM, Ochieng DJ, Levy SB (2009) Commensals: underappreciated reservoir of antibiotic resistance. *Microbe* 4:231-238.
- Marshall BM, Levy SB (2011) Food animals and antimicrobials: Impacts on human health. *Clinical Microbiology Reviews* 24:718-733.
- Martínez-Martínez L, Pascual A, Jacoby GA (1998) Quinolone resistance from a transferable plasmid. *The Lancet* 351:797-799.
- Mateu E, Martin M (2001) Why is Anti-Microbial Resistance a Veterinary Problem As Well? *Journal of Veterinary Medicine, Series B* 48:569-581.
- Maynard C, Bekal S, Sanschagrín F, Levesque RC, Brousseau R, Masson L, Larivière S, Harel J, Larivie S (2004) Heterogeneity among virulence and antimicrobial resistance gene profiles of extraintestinal *Escherichia coli* isolates of animal and

- human origin. *Journal of clinical microbiology* 42:5444-5452.
- Meganck V, Hoflack G, Opsomer G (2014) Advances in prevention and therapy of neonatal dairy calf diarrhoea: a systematical review with emphasis on colostrum management and fluid therapy. *Acta Veterinaria Scandinavica* 56:75.
- Mellmann A, Bielaszewska M, Karch H (2009) Intrahost genome alterations in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Gastroenterology* 136:1925-1938.
- Melton-Celsa AR (2015) Shiga toxin (Stx) classification, structure and function. En: Sperandio V, Hovde CJ (eds) Enterohemorrhagic *Escherichia coli* and other shiga toxin-producing *E. coli*. ASM Press, Washington DC, pp 37-54.
- Menge C, Wieler LH, Schlapp T, Baljer G (1999) Shiga toxin 1 from *Escherichia coli* blocks activation and proliferation of bovine lymphocyte subpopulations in vitro. *Infection and Immunity* 67:2209-2217.
- Mercado EC, Rodríguez SM, D'Antuono AL, Cipolla AL, Elizondo AM, Rossetti CA, Malena R, Méndez MA (2003) Occurrence and characteristics of CS31A antigen-producing *Escherichia coli* in calves with diarrhoea and septicaemia in Argentina. *Journal of veterinary medicine - B, Infectious diseases and veterinary public health* 50:8-13.
- Michell AR (2005) Why has oral rehydration for calves and children diverged: direct vs. indirect criteria of efficacy. *Research in Veterinary Science* 79:177-181.
- Montes de Oca S, Talavera-Rojas M, Soriano-Vargas E, Barba-León J, Vazquez-Navarrete J (2015) Determination of extended spectrum β -lactamases/AmpC β -lactamases and plasmid-mediated quinolone resistance in *Escherichia coli* isolates obtained from bovine carcasses in Mexico. *Tropical Animal Health and Production* 47:975-981.
- Moreira CG, Carneiro SM, Nataro JP, Trabulsi LR, Elias WP (2003) Role of type I fimbriae in the aggregative adhesion pattern of enteroaggregative *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters* 226:79-85.
- Moulin-Schouleur M, Schouleur C, Tailliez P, Kao MR, Brée A, Germon P, Oswald E, Mainil J, Blanco M, Blanco J (2006) Common virulence factors and genetic relationships between O18:K1:H7 *Escherichia coli* isolates of human and avian origin. *Journal of Clinical Microbiology* 44:3484-3492.

- Moxley RA, Smith DR (2010) Attaching-effacing *Escherichia coli* infections in cattle. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice* 26:29-56.
- Nagy B, Fekete PZ (1999) Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in farm animals. *Veterinary Research* 30:259-284.
- Nagy B, Fekete PZ (2005) Enterotoxigenic *Escherichia coli* in veterinary medicine. *International Journal of Medical Microbiology* 295:443-454.
- Nandi S, Maurer JJ, Hofacre C, Summers AO (2004) Gram-positive bacteria are a major reservoir of Class 1 antibiotic resistance integrons in poultry litter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:7118-7122.
- Nastasi A, Mammina C (2001) Presence of class I integrons in multidrug-resistant, low-prevalence *Salmonella* serotypes, Italy. *Emerging Infectious Diseases* 7:455-458.
- Nataro JP, Kaper JB (1998) Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews* 11:142-201.
- Nguyen TD, Vo TT, Vu-Khac H (2011) Virulence factors in *Escherichia coli* isolated from calves with diarrhea in Vietnam. *Journal of Veterinary Science* 12:159-164.
- Nield BS, Holmes AJ, Gillings MR, Recchia GD, Mabbutt BC, Nevalainen KMH, Stokes HW (2001) Recovery of new integron classes from environmental DNA. *FEMS Microbiology Letters* 195:59-65.
- O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R (2000) Biofilm formation as microbial development. *Annual Review of Microbiology* 54:49-79.
- Odeón AC (2001) Diarrea neonatal de los terneros; etiopatogenia , tratamiento y control. *Sitio Argentino de Producción Animal* 1:1-5.
- Ok M, Güler L, Turgut K, Ok Ü, Sen I, Gündüz IK, Birdane MF, Güzelbektes H (2009) The studies on the aetiology of diarrhoea in neonatal calves and determination of virulence gene markers of *Escherichia coli* strains by multiplex PCR. *Zoonoses and Public Health* 56:94-101.
- Olive DM (1989) Detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* after polymerase chain reaction amplification with a thermostable DNA polymerase. *Journal of Clinical Microbiology* 27:261-265.
- Olive DM, Bean P (1999) Principles and applications of methods for DNA-Based typing

- of microbial organisms. *Journal of Clinical Microbiology* 37:1661-1669.
- Orand J-P, Mouling G, Vindel EE (2016) Combatir la resistencia antimicrobiana a través del enfoque «una salud»: acciones y estrategias de la OIE. En: Sesión General, organización mundial de sanidad animal. París, pp 1-11.
- Orman BE, Piñeiro SA, Arduino S, Galas M, Melano R, Caffer MI, Sordelli DO, Centrón D (2002) Evolution of multiresistance in nontyphoid *Salmonella* serovars from 1984 to 1998 in Argentina. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46:3963-3970.
- Orndorff PE, Devapali A, Palestrant S, Wyse A, Everett M Lou, Bollinger RR, Parker W (2004) Immunoglobulin-mediated agglutination of and biofilm formation by *Escherichia coli* K-12 require the Type 1 pilus fiber. *Infection and Immunity* 72:1929-1938.
- Park CH, Robicsek A, Jacoby GA, Sahm D, Hooper DC (2006) Prevalence in the United States of *aac(6)-Ib-cr* encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50:3953-3955.
- Pellegrino R, Galvalisi U, Scavone P, Sosa V, Zunino P (2003) Evaluation of *Proteus mirabilis* structural fimbrial proteins as antigens against urinary tract infections. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 36:103-110.
- Perreten V (2005) Resistance in the food chain and in bacteria from animals: relevance to human infections. En: White DG, Alekshun MN, McDermott PF (eds) *Frontiers in antimicrobial resistance: a tribute to Stuart B. Levy*. ASM Press, Washington DC, pp 446-464.
- Persad AK, LeJeune J (2015) Animal reservoirs of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. En: Sperandio V, Hovde CJ (eds) *Enterohemorrhagic Escherichia coli and other shiga toxin-producing E. coli*. ASM Press, pp 211-230.
- Picco NY, Alustiza FE, Bellingeri R V., Grosso MC, Motta CE, Larriestra AJ, Vissio C, Tiranti KI, Terzolo HR, Moreira AR, Vivas AB (2015) Molecular screening of pathogenic *Escherichia coli* strains isolated from dairy neonatal calves in Cordoba province, Argentina. *Revista Argentina de Microbiología* 47:4-11.
- Pratt LA, Kolter R (1998) Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Molecular Microbiology* 30:285-293.
- Prober HM, Gibson GR (2002) Bacterial biofilms in the human gastrointestinal tract.

Current Issues in Intestinal Microbiology 3:23-27.

Riley LW, Remis RS, Helgerson SD, McGee HB, Wells JG, Davis BR, Hebert RJ, Olcott ES, Johnson LM, Hargrett NT, Blake PA, Cohen ML (1983) Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. New England Journal of Medicine 308:681-685.

Rivas M, Chinen I, Miliwebsky E, Masana M (2015) Risk factors for Shiga toxin-producing *Escherichia coli* associated human diseases. En: Spreandio V, Hovde CJ (eds) Enterohemorrhagic *Escherichia coli* and other shiga toxigen-producing *E. coli*. ASM press, pp 361-380.

Robicsek A, Strahilevitz J, Sahm DF, Jacoby GA, Hooper DC (2006) qnr prevalence in ceftazidime-resistant enterobacteriaceae isolates from the United States. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 50:2872-2874.

Roosendaal E, Jacobs AAC, Rathman P, Sondermeyer C, Stegehuis F, Oudega B, Graaf FK (1987) Primary structure and subcellular localization of two fimbrial subunit-like proteins involved in the biosynthesis of K99 fibrillae. Molecular Microbiology 1:211-217.

Rosser SJ, Young H-K (1999) Identification and characterization of class 1 integrons in bacteria from an aquatic environment. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 44:11-18.

Salvadori MG, Valadares GF, Leite D, Blanco J, Yano T (2003) Virulence factors of *Escherichia coli* isolated from calves with diarrhea in Brazil. Brazilian Journal of Microbiology 34:230-25.

Sánchez R, Fernández-Baca V, Díaz MD, Muñoz P, Rodríguez-Créixems M, Bouza E (1994) Evolution of susceptibilities of *Campylobacter* spp. to quinolones and macrolides. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 38:1879-1882.

Scheutz F (2011) Characteristics of the enteroaggregative Shiga toxin/verotoxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 strain causing the outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, May to June 2011. Euro Surveill: European communicable disease bulletin 16:1-8.

Schlapp G, Scavone P, Zunino P, Härtel S (2011) Development of 3D architecture of uropathogenic *Proteus mirabilis* batch culture biofilms-A quantitative confocal

- microscopy approach. *Journal of Microbiological Methods* 87:234-240.
- Shaheen BW, Nayak R, Foley SL, Boothe DM (2013) Chromosomal and plasmid-mediated fluoroquinolone resistance mechanisms among broad-spectrum-cephalosporin-resistant *Escherichia coli* isolates recovered from companion animals in the USA. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 68:1019-1024.
- Sherlock O, Schembri MA, Reisner A, Klemm P (2004) Novel roles for the AIDA adhesin from diarrheagenic. *Journal of Bacteriology* 186:8058-8065.
- Sherlock O, Vejborg RM, Klemm P (2005) The TibA adhesin / invasin from enterotoxigenic *Escherichia coli* is self recognizing and induces bacterial aggregation and biofilm formation. *Infection and Immunity* 73:1954-1963.
- Smith KE, Besser JM, Hedberg CW, Leano FT, Bender JB, Wicklund JH, Johnson BP, Moore KA, Osterholm MT (1999) Quinolone-resistant *Campylobacter jejuni* infections in Minnesota, 1992–1998. *New England Journal of Medicine* 340:1525-1532.
- Smith DR, Moxley RA, Klopfenstein TJ, Erickson GE (2009) A randomized longitudinal trial to test the effect of regional vaccination within a cattle feedyard on *Escherichia coli* O157:H7 rectal colonization, fecal shedding, and hide contamination. *Foodborne Pathogens and Disease* 6:885-892.
- Sosa V, Zunino P (2013) Diversity of *Moraxella* spp. strains recovered from infectious bovine keratoconjunctivitis cases in Uruguay. *Journal of Infection in Developing Countries* 7:819-824.
- Studier FW, Moffatt BA (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of Molecular Biology* 189:113-130.
- Tacket CO, Dominguez LB, Fisher HJ, Cohen ML (1985) AN outbreak of multiple-drug-resistant *salmonella enteritis* from raw milk. *JAMA* 253:2058-2060.
- Tartof SY, Solberg OD, Manges AR, Riley W, Riley LW (2005) Analysis of a uropathogenic *Escherichia coli* clonal group by Multilocus Sequence Typing. *Journal of Clinical Microbiology* 43:5860-5864.
- Tenover FC (2006) Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *American Journal of Infection Control* 34:S3-S10.

- Timm CD, Irino K, Gomes TA, Vieira MM, Guth BE, Vaz TM, Moreira CN, Aleixo JA (2007) Virulence markers and serotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, isolated from cattle in Rio Grande do Sul, Brazil. *Letters in Applied Microbiology* 44:419-425.
- Toolan HW (1954) Transplantable Human Neoplasms Maintained in Cortisone- treated Laboratory Animals: H.S.#1; H.Ep.#1; H.Ep.#2; H.Ep.#3; and H.Emb.Rh.#1. *Cancer Research* 14:660-666.
- Tozzoli R, Scheutz F (2014) Diarrhoeagenic *Escherichia coli* infection in humans. En: *Pathogenic Escherichia coli. Molecular and Cellular Microbiology*. Caister Academic Press, Norfolk, pp 1-18.
- Uhlich GA, Cooke PH, Solomon EB (2006) Analyses of the red-dry-rough phenotype of an *Escherichia coli* O157:H7 strain and its role in biofilm formation and resistance to antibacterial agents. *Applied and Environmental Microbiology* 72:2564-2562.
- United States Department of Agriculture (2008a) Dairy 2007 Part II: Changes in the U.S. Dairy Cattle Industry, 1991–2007. *USDA Reports* 1-92.
- United States Department of Agriculture (2008b) Beef 2007 - 2008. Part I: Reference of beef cow-calf management practices in the United States, 2007-2008. *USDA Reports* 1-89.
- Valat C, Forest K, Auvray F, Métayer V, Méheut T, Polizzi C, Gay E, Haenni M, Oswald E, Madec J-Y (2014) Assessment of adhesins as an indicator of pathovar-associated virulence factors in bovine *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* 80:7230-7234.
- Van Bost S, Jacquemin E, Oswald E, Mainil J (2003) Multiplex PCRs for identification of *Escherichia coli* virulence genes. *Journal of clinical microbiology* 38:4480-4482.
- Van Den Bogaard AE, Willems R, London N, Top J, Stobberingh EE (2002) Antibiotic resistance of faecal enterococci in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 497-505.
- Versalovic J, Schneider M, De Bruijn FJ, Lupski J R (1994) Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence based polymerase chain reaction. *Methods in Molecular and Cellular Biology* 5:25-40.
- Vidal O, Longin R, Prigent-Combaret C, Dorel C, Hooreman M, Lejeune P (1998)

- Isolation of an *Escherichia coli* K-12 mutant strain able to form biofilms on inert surfaces: Involvement of a new ompR allele that increases curli expression. *Journal of Bacteriology* 180:2442-2449.
- Vignoli R, Varela G, Mota MI, Cordeiro NF, Power P, Ingold E, Gadea P, Sirok A, Schelotto F, Ayala JA, Gutkind G (2005) Enteropathogenic *Escherichia coli* strains carrying genes encoding the PER-2 and TEM-116 extended-spectrum β -lactamases isolated from children with diarrhea in Uruguay. *Journal of Clinical Microbiology* 43:2940-2943.
- Vignoli R, Cordeiro N, Seija V, Schelotto F, Radice M, Ayala J, Power P, Gutkind G (2006) Entorno genético de CTX-M-2 en aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* provenientes de pacientes hospitalizados en Uruguay. *Revista Argentina de Microbiología* 38:84-88.
- Vignoli R, García-Fulgueiras V, Cordeiro NF, Bado I, Seija V, Aguerrebere P, Laguna G, Araújo L, Bazet C, Gutkind G, Chabalgoity J (2016) Extended-spectrum β -lactamases, transferable quinolone resistance, and virulotyping in extra-intestinal *E. coli* in Uruguay. *The Journal of Infection in Developing Countries* 10:43-52.
- Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR (2007) Naïve Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology* 73 :5261-5267.
- Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* 173:697-703.
- Wieler LH, Schwanitz A, Vieler E, Busse B, Steinrück H, Kaper JB, Baljer G (1998) Virulence properties of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains of serogroup O118, a major group of STEC pathogens in calves. *Journal of Clinical Microbiology* 36:1604-1607.
- Windeyer MC, Leslie KE, Godden SM, Hodgins DC, Lissemore KD, LeBlanc SJ (2014) Factors associated with morbidity, mortality, and growth of dairy heifer calves up to 3 months of age. *Preventive Veterinary Medicine* 113:231-240.
- Witte W (1998) Medical Consequences of Antibiotic Use in Agriculture. *Science* 279:996-997.
- Witte W, Strommenger B, Stanek C, Cuny C (2007) Methicillin-resistant *Staphylococcus*

aureus ST398 in humans and animals, Central Europe. Emerging Infectious Diseases 13:255-258.

Yu HS, Lee JC, Kang HY, Ro DW, Chung JY, Jeong YS, Tae SH, Choi CH, Lee EY, Seol SY, Lee YC, Cho DT (2003) Changes in gene cassettes of class 1 Integrons among. Journal of Clinical Microbiology 41:5429-5433.

Zhang WL, Bielaszewska M, Liesegang A, Tschäpe H, Schmidt H, Bitzan M, Karch H (2000) Molecular characteristics and epidemiological significance of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26 strains. Journal of Clinical Microbiology 38:2134-2140.

Zweifel C, Cernela N, Stephan R (2013) Detection of the emerging Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26: H11/H- sequence type 29 (ST29) clone in human patients and healthy cattle in Switzerland. Applied and Environmental Microbiology 79:5411-5413.

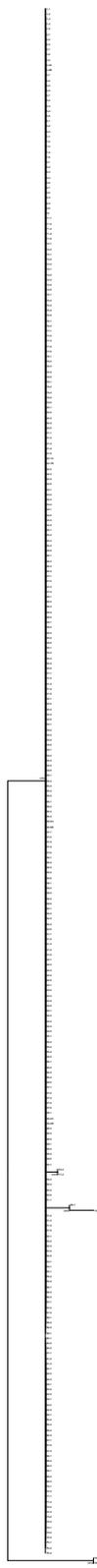
ANEXO I

Planilla recolección de muestras

Animal	Edad	Síntomas de Diarrea			Tratamiento previo		Sistema de cría			Establecimiento/ Departamento	Observaciones
		Leve	Moderada	Grave	Si	No	Extensivo	Semi-intensivo	Intensivo		
1											
2											
3											
4											
5											
6											
7											
8											

ANEXO II

Filogenia de la colección



Análisis filogenético de los aislamientos de *E. coli*. Dendograma generado con el método de máxima verosimilitud en el programa MEGA 7. Árbol consenso luego de realizadas 1000 réplicas. Escala: 0,005 sustituciones por sitio.

ANEXO IV

Publicaciones

Parte de los resultados presentados en el capítulo 1 de esta tesis fueron publicados en la revista arbitrada internacional *The Journal of Infection in Developing Countries*.

Original Article

Prevalence of *Escherichia coli* adhesion-related genes in neonatal calf diarrhea in Uruguay

Ana Umpiérrez¹, Sofía Acquistapace^{1,2}, Sofía Fernández¹, Martín Oliver¹, Patricia Acuña², Eduardo Reolón², Pablo Zunino¹

¹ Departamento de Microbiología. Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo, Uruguay

² Departamento de Investigación y Desarrollo. Laboratorios Santa Elena-VIRBAC SA, Montevideo, Uruguay

Abstract

Introduction: Neonatal calf diarrhea (NCD), one of the most important diseases of neonatal dairy and beef calves in Uruguay, has become relevant in association with intensive systems. This disease generates substantial economic losses every year worldwide as a result of increased morbidity and mortality. *Escherichia coli*, one of the pathogens associated with NCD, can express several fimbrial and afimbrial adhesins. The objective of this study was to assess the presence of *clpG*, *f5*, *f17A*, *f17G(II)*, and *f17G(I)* genes that encode three important adhesins expressed in diarrheagenic *E. coli*: F5, F17 and CS31A, isolated from feces of calves in Uruguay.

Methodology: Feces of 86 (70 diarrheic and 16 healthy) calves, from 15 animal facilities in Uruguay, were collected between 2012 and 2013. Biochemical and molecular identification were performed to finally obtain 298 *E. coli* isolates. Partial amplification of adhesion-related genes was performed by polymerase chain reaction.

Results: The most prevalent gene was *f17A* (31.2%), followed by *f17G(II)*, *clpG*, *f17G(I)* and *f5* (25.8%, 17.5%, 3.7% and 0.7%, respectively). All genes were present in diarrheic and healthy animals except *f5* and *f17G(I)*; these genes were present only in affected calves, although in low numbers.

Conclusions: This is the first report of the presence of F5, F17, and CS31A genes in *E. coli* strains from NCD cases in Uruguay. Prevalence values of the genes, except *f5*, were in accordance with regional findings. It is expected that further characterization of locally transmitted strains will contribute to control a problem of regional and international magnitude.

Key words: *Escherichia coli*, NCD, *clpG*, *f5*, *f17A*; *f17G(II)*

J Infect Dev Ctries 2016; 10(5):472-477. doi:10.3855/jidc.7102

(Received 7 May 2015 – Accepted 29 July 2015)

Copyright © 2016 Umpiérrez *et al.* This is an open-access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Introduction

Neonatal calf diarrhea (NCD), an important infectious disease that affects dairy and beef calves, is considered a worldwide challenge for bovine producers and industry [1]. Nowadays, there is a remarkable interest to promote production efficiency by improving productive intensive systems. However, these systems have disadvantages such as animal stress and inadequate sanitary conditions, among other factors, that favor the rapid spread of diseases caused by microorganisms [2-4]. Therefore, NCD generates substantial economic losses every year all over the world as a result of increased morbidity and mortality rates [2].

NCD has a complex etiopathogenesis, and *Escherichia coli*, together with rotavirus, coronavirus, *Cryptosporidium parvum* and *Clostridium perfringens*, are the pathogens most commonly associated with this disease [5].

E. coli colonizes the gastrointestinal tract of humans and animals and can coexist as part of the gut microbiota, except in immunocompromised patients or when the epithelial barrier is somehow altered [6]. Nonetheless, there are different highly adapted *E. coli* pathotypes that can settle in different niches and cause disease in healthy individuals and animals [6]. Adhesion to host cells is a crucial step for the establishment of the infection and is achieved through fimbrial and afimbrial adhesins and/or outer membrane proteins such as intimin [6-8], among other factors. Diverse fimbrial and afimbrial adhesins can be expressed in intestinal and extraintestinal *E. coli* strains causing disease in domestic and farm animals [9].

One of the main fimbrial antigens present in bovine diarrheagenic *E. coli* is the plasmid-encoded F5 (formely K99) fimbria [10,11], which mediates adherence to the ileum and establishes first steps of colonization in the bovine intestine [12]. F5 strains are

usually isolated from calves between one and five days of age with diarrhea, and it has been reported that this observation is due to the decline of the F5 receptors' expression in the bovine epithelia within days [13,14].

CS31A is an afimbrial adhesin of *E. coli*, immunologically related to the F4 fimbria (formerly K88), and also plasmid encoded. The CS31A antigen was first recognized as a capsule-like surface protein around the bacteria [15], and it has been extensively studied in septicemic and enterotoxigenic *E. coli* strains [15-18]. CS31A is usually expressed with other fimbrial antigens [16,19]. Particularly, it has been reported that F17 fimbria and CS31A are highly associated [19,20].

The F17-related fimbriae family comprises four types of fimbria: F17a, F17b, F17c, and F111 fimbria, which differ in the amino acid sequences of the structural subunit (F17A) and the adhesin minor subunit F17G, which is composed of the subfamilies of adhesins I and II [9]. This fimbriae family is encoded in the chromosome of *E. coli* strains isolated from diarrheagenic and septicemic cows and lambs from different outbreaks and also from humans suffering urinary tract infections [9,16,19,21,22].

The general aim of this study was to assess for the first time the presence of *clpG*, *f5*, *fl7A*, *fl7G(II)*, and *fl7G(I)* genes that encode three crucial adhesins of *E. coli* associated with NCD, isolated from feces of healthy and ill calves throughout Uruguay.

Methodology

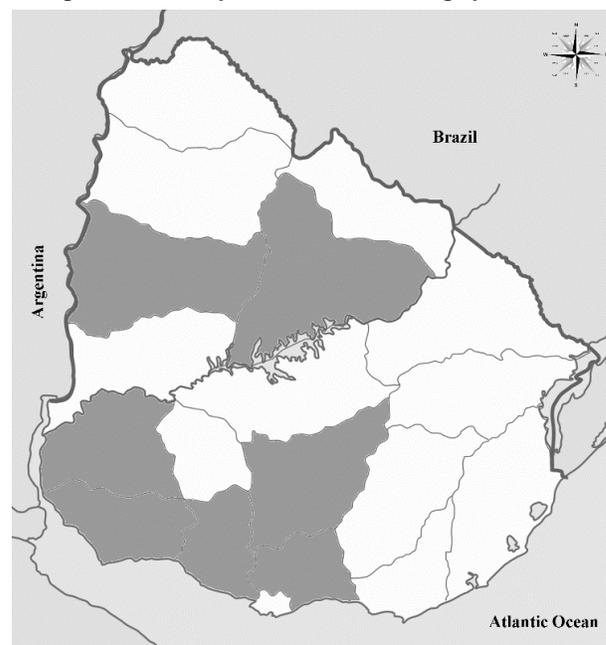
Media and reagents

The isolation of *E. coli* strains from feces was done in MacConkey agar plates, whereas tryptone soya broth (TSB) and tryptone soya agar (TSA) were employed for further routine cultures. All media were purchased from Oxoid (Basingstoke, UK). Routine cultivation was at 37°C for 24 hours. Strains were stored at -20°C and -80°C, using TSB medium supplemented with 15% glycerol.

Sample collection

Feces of 86 (70 diarrheic and 16 healthy) calves younger than 35 days of age from 15 animal facilities throughout Uruguay were collected by technicians and shipped chilled to the laboratory between 2012 and 2013 (Figure 1). The criteria for sampling included animals with and without symptoms of diarrhea as well as animal samples from intensive (n = 14) and extensive systems (n = 1). All samples were plated onto selective MacConkey agar plates within 12 hours following collection. After 24 hours of incubation at 37°C, at least

Figure 1. Map of Uruguay. Collection zones (provinces) throughout the country are identified in dark gray.



five lactose-positive colonies of each animal were selected.

Biochemical and molecular identification

For biochemical identification of each isolate, the following tests were performed: Gram stain and oxidase, catalase activity, citrate utilization, oxidative/fermentation glucose, indol, and Voges-Proskauer; growth at 45°C in EC (DIFCO; New Jersey, USA) medium was also investigated. All biochemical analyses were performed after 24 hours of incubation at 37°C, except for the citrate test (up to 72 hours of incubation at 37°C) and EC growth (24–48 hours at 45°C). Also, morphology of the colony and occurrence of swarming motility were taken into account in the isolate descriptions.

Further molecular identification was done by polymerase chain reaction (PCR) amplification of the 16S rDNA with 27F and 1492R universal primers. PCR was performed in a 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, USA) thermocycler, using 0.2 mM dNTPs, 5 µM of each primer, 2 µL of DNA, 3.0 mM of MgCl₂, 1X of buffer, and 1U Taq DNA polymerase (Invitrogen, Waltham, USA). Total DNA was extracted by boiling a single colony of each strain resuspended in distilled water followed by a spin-dry step to separate the cell debris from the DNA. Briefly, the cycling program comprised an initial activation step at 94°C for 3 minutes, 30 cycles of amplification (denaturation at 94°C for 1 minute, annealing for 1

minute at 50°C followed by an extension at 72°C for 90 seconds), a final extension step at 72°C for 10 minutes, and chilling at 4°C. PCR products were analyzed by electrophoresis in 0.8% agarose gels, stained with GelRed, and sequenced (MACROGEN, Seoul, Korea). Obtained sequences were aligned using the sequence alignment editor program BioEdit (version 7.0.5.3) and analyzed with BLASTN (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) and Ribosomal Database Project (<http://rdp.cme.msu.edu/>).

Presence of fimbrial and non-fimbrial adhesins

For the evaluation of virulence factors in the whole *E. coli* collection, partial amplification of the *f5* gene of F5 fimbria, the structural gene *clpG* of CS31A capsule-like adhesin, the structural fimbrial gene *fl7A*, and adhesins genes *fl7G(I)* and *fl7G(II)* of F17 fimbria was accomplished using specific primers (Table 1) and a 2720 Thermal Cycler thermocycler (Applied Biosystems). DNA was released as described before. Each reaction mix comprised 0.2 mM of each dNTPs, 0.32 µM of primers, 3.0 mM of MgCl₂, 1X of buffer, 2.5 ng/µL of DNA, and 1U Taq DNA polymerase (Invitrogen). The thermocycler program comprised an initial activation step at 94°C for 5 minutes, then 30 cycles of amplification (denaturation at 94°C for 2 minutes, annealing for 1 minute [at 58°C for *f5*, 61°C for *clpG*, 59°C for *fl7A*, and 58°C for *fl7G(I)* and *fl7G(II)*] followed by an extension at 72°C for 1 minute), a final extension at 72°C for 10 minutes, and chilling to 4°C. PCR products were analyzed by electrophoresis in 1.2% agarose gels stained with GelRed and photographed under UV light. A 1 Kb Plus DNA ladder (Thermo Scientific, Waltham, USA) was used to determine the molecular size of the PCR products. After PCR amplifications, one representative PCR product of each gene was sequenced to confirm the presence of *clpG*, *f5*, *fl7A*, *fl7G(II)*, and *fl7G(I)*.

Statistical analyses

Odds ratio (OR) was used to measure the association between the presence of the evaluated genes, the occurrence of symptoms, and geographical origins of the isolates.

Results

Construction of *E. coli* collection from feces of calves

After biochemical identification, a collection of 298 *E. coli* isolates was generated. Then, molecular identification by PCR amplification and sequencing of 16S rRNA gene confirmed previous biochemical identification results. In all cases, nucleotide sequences presented 100% similarity with published sequences for the *E. coli* 16S rRNA gene. Out of the 298 isolates, 237 corresponded to 70 animals with symptoms of diarrhea (mild to severe), whereas 61 isolates corresponded to 16 animals that did not have any symptoms of the disease at the moment of feces sampling.

Presence of F5, F17, and CS31A genes

A PCR product representative of each gene was sequenced, confirming the presence of *clpG*, *f5*, *fl7A*, *fl7G(II)*, and *fl7G(I)* along the collection. Obtained nucleotide sequences presented over 98% of similarity with published sequences for each gene.

The presence of the different *E. coli* adhesion-related genes is summarized in Table 2. The structural subunit gene of CS31A adhesin *clpG* was present in 17.5% of the isolates, whereas 31.2% of the isolates were positive for the F17 structural fimbrial subunit gene *fl7A*. Regarding F17 adhesin genes, 25.8% of the isolates were positive for *fl7G(II)*, while only 3.7% were positive for *fl7G(I)*. Furthermore, 22.8% of the isolates were positive for *fl7A* and *fl7G(II)* simultaneously, and 3.7% carried both *fl7A* and *fl7G(I)*.

Table 1. Primers used in polymerase chain reaction for the determination of virulence genes in the *E. coli* sample collection

Primer	Sequence (5'--3')	Gene position	Size (bp)	Reference
<i>clpG</i> -F	GGGCGCTCTCTCCTTCAAC	153-172	403	[23]
<i>clpG</i> -R	CGCCCTAATTGCTGGCGAC	537-556		
<i>f5</i> -F	TATTATCTTAGGTGGTATGG	21-40	314	[24]
<i>f5</i> -R	GGTATCCTTTAGCAGCAGAGTATTTC	311-334		
<i>fl7A</i> -F	GCAGAAAATTCAATTTATCCTTGG	3-26	537	
<i>fl7A</i> -R	CTGATAAGCGATGGTGTAATTAAC	517-540		
<i>fl7G(I)</i> -F	CGGAGCTAATACTGCATCAACC	399-420	615	[20]
<i>fl7G(I)</i> -R	TGTTGATATTCCGTTAACCGTAC	992-1014		
<i>fl7G(II)</i> -F	CGTGGGAAATTATCTATCAACG	396-417	615	
<i>fl7G(II)</i> -R	TGTTGATATTCCGTTAACCGTAC	992-1014		

Table 2. Prevalence of virulence genes in healthy and diarrheic animals

	Diarrheic animals (n = 237)	Healthy animals (n = 61)	Total isolates	Total prevalence	Prevalence (diarrheic)	Prevalence (healthy)
<i>f17A</i>	68	25	93	31.2%	28.7%	40.9%
<i>f17G(II)</i>	52	25	77	25.8%	21.9%	40.9%
<i>f17G(I)</i>	11	0	11	3.7%	4.6%	0%
<i>f5</i>	2	0	2	0.7%	0.8%	0%
<i>clpG</i>	41	11	52	17.5%	17.3%	18.0%
<i>f17A-f17G(II)</i>	43	25	68	22.8%	18.1%	40.9%
<i>f17A-f17G(I)</i>	11	0	11	3.7%	4.6%	0%
<i>f17A-f17G(II)-clpG</i>	9	6	15	5.0%	3.8%	9.8%
<i>f17A-f17G(I)-clpG</i>	1	0	1	0.3%	0.4%	0%

genes. These results showed that the majority of F17-positive isolates carried the *f17G(II)* adhesin gene. In addition, 5% of the *f17A-f17G(II)* positive strains were also *clpG* positive, and 0.3% of the *f17A-f17G(I)* were also *clpG* positive. In this study, *f17A* and *f17G(II)* fimbrial genes were present in diarrheic animals with similar prevalences (28.7% and 21.9%, respectively), as well as in healthy animals (40.9% each). Also, the *clpG* gene was present in diarrheic and healthy animals, with very similar prevalence values (17.3% and 18%, respectively). Finally, PCR analyses showed that the *f5* gene was present in 0.7% (two isolates) of the *E. coli* samples. Moreover, *f5* was not present together within either of the other evaluated genes. Even *f5* and *f17G(I)* genes were found in small proportions within the samples, and both were present only in animals with symptoms of NCD.

No significant association between the presence of F17, CS31A, and F5 genes and NCD symptoms was observed. Moreover, it was not possible to associate the different genotypes with geographical origins, productive systems, or isolation dates.

Discussion

Although *E. coli* is part of the commensal gut microbiota, different strains are responsible for intestinal infections of humans and animals [8,25]. F5 and F17 fimbriae and CS31A adhesin are among the most relevant adhesins in *E. coli* infections in calves, lambs, pigs and dogs, and are essential in the first colonization stages [8,14,17,26]. Additionally, recent studies have demonstrated that F17 and F5 together with F41 are significantly associated with calf diarrhea [27]. Furthermore, previous work has established that the *E. coli* F17 family is associated with CS31A in bovine diarrhea and septicemia [16]. Also, an explicit association between the presence of these adhesins and the heat-stable enterotoxin (STa) and the

enteroaggregative heat-stable toxin 1 (EAST1) has been observed [28].

In the present work, genotypic analyses of 298 isolates of *E. coli* allowed us to demonstrate the presence of *E. coli* fimbrial and non-fimbrial adhesin genes in the feces of calves. Prevalences of CS31A (17.5%) and F17 (31.2%) genes were in accordance with those from previous reports in France, New Zealand, Iran, and in countries of the region such as Argentina and Brazil, but the F5 gene was less prevalent (<1%) in the present study [17,28-31]. These results are in accordance with a study by Kolenda *et al.*, who reported a significant F5 prevalence reduction over the last decades [28]. One explanation for this reduction could be the use in pregnant cows of vaccine formulations that include the F5 antigen [32].

Otherwise, F17 was the most prevalent virulence factor gene in our collection, followed by CS31A. However, only a small proportion of F17+ strains were also CS31A+, a lower prevalence compared to that in other studies [17,28]. Moreover, we revealed that *f17A* and *f17G(II)* were present together in a high proportion of the isolates compared to *f17A* and *f17G(I)*. This observation had been reported previously, and a prominent presence of F17 subfamily II adhesin compared to subfamily I adhesin in bovine *E. coli* isolates was previously detected [20,33]. Conversely, F17 and CS31A genes were also present in some animals without NCD symptoms. This observation could be explained by the occurrence of horizontal gene transfer, particularly in the case of CS31A genes, which are plasmid encoded [26]. In this study, we observed a relatively high F17 gene prevalence in healthy animals. Even though recent studies have observed an association between the presence of F17 and calf diarrhea, Kolenda *et al.* observed a high prevalence of this fimbria in healthy calves [27]. These authors propose that this fimbria could require the presence of

other virulence factors intervening in the etiology of diarrhea or that they are not functionally expressed [27].

It is important to highlight that although the presence and expression of *E. coli* virulence genes in locally transmitted strains is relevant for the development of the disease, there are other risk factors involved. Rotavirus, coronavirus, *Cryptosporidium parvum*, and *Clostridium perfringens* are also associated with NCD, particularly following the first week of birth [5]. Also, the status of the animals, management procedures, and environmental conditions are all together risk factors that would increase the incidence of NCD [2,4]. Hence, the presence of F5, F17, and CS31A genes alone, regardless of the management factors and the presence of other pathogens mentioned above, do not necessarily determine the occurrence of NCD.

Conclusions

This study reports the presence of the genes that encode important adhesion-related factors such F5, F17, and CS31A in *E. coli* strains from NCD cases for the first time in Uruguay. Prevalence of all evaluated adhesion-related genes, except *f5*, was in accordance with regional diverse surveys. *F17A* and *f17G(II)* were the most frequently detected genes within our collection.

Results obtained in this study will contribute to the knowledge and characterization of locally transmitted *E. coli* strains in our country and will provide information to manage a problem of regional and international magnitude.

Acknowledgements

This work was supported by FCE_3_2011_1_6359 (ANII, Uruguay), by a grant from ANII (POS_NAC_2012_1_8657) and Santa Elena-VIRBAC SA. We are very grateful to all the Veterinarians and Farmers who collaborated in sample collection. Authors especially thank Dr. Rosario de los Santos for her remarkable collaboration.

References

- Lorenz I, Fagan J, More SJ (2011) Calf health from birth to weaning II. Management of diarrhoea in pre-weaned calves. *Irish Vet J* 64: 1-9.
- Bazeley K (2003) Investigation of diarrhoea in the neonatal calf. *In Practice* 25: 152-159.
- Gulliksen SM, Jor E, Lie KI, Hamnes IS, Løken T, Åkerstedt J, Østerås O (2009) Enteropathogens and risk factors for diarrhea in Norwegian dairy calves. *J Dairy Sci* 92: 5057-5066.
- Marcé C, Guatteo R, Bareille N, Fourichon C (2010) Dairy calf housing systems across Europe and risk for calf infectious diseases. *Animal* 4: 1588-1596.
- Foster DM, Smith GW (2009) Pathophysiology of diarrhea in calves. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 25: 13-36.
- Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL (2004) Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 2: 123-140.
- Croxen MA, Finlay BB (2010) Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat Rev Microbiol* 8: 26-38.
- Mainil J (2013) *Escherichia coli* virulence factors. *Vet Immunol Immunopathol* 15: 2-12.
- Le Bouguéneq L, Bertin Y (1999) AFA and F17 adhesins produced by pathogenic *Escherichia coli* strains in domestic animals. *Vet Res* 30: 317-342.
- Isaacson RE (1978) K99 surface antigen of *Escherichia coli*: antigenic characterization. *Infect Immun* 22: 555-559.
- Nagy B, Fekete PZ (1999) Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in farm animals. *Vet Res* 30: 259-284.
- Franck SM, Bosworth BT, Moon HW (1998) Multiplex PCR for enterotoxigenic, attaching and effacing, and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from calves. *J Clin Microbiol* 36: 1795-1797.
- Runnels PL, Moon HW, Schneider RA (1980) Development of resistance with host age to adhesion of K99+ *Escherichia coli* to isolated intestinal epithelial cells. *Infect Immun* 28: 298-300.
- Gyles CL, Fairbrother JM (2010) *Escherichia coli*. In Gyles CL, Prescott JF, Songer JG, Thoen CO, editors. *Pathogenesis of bacterial infections in animals*. Oxford: Wiley-Blackwell. 267-308.
- Girardeau JP, De Vartanian M, Ollier JL, Conterpois M (1988) CS31A, a new K88-related fimbrial antigen on bovine enterotoxigenic and septicemic *Escherichia coli* strains. *Infect Immun* 56: 2180-2188.
- Bertin Y, Girardeau JP, Darfeuille-Michaud A, Contrepois M (1996a) Characterization of 20K fimbria, a new adhesin of septicemic and diarrhea-associated *Escherichia coli* strains, that belongs to a family of adhesins with N-Acetyl-D-Glucosamine recognition. *Infect Immun* 64: 332-342.
- Mercado EC, Rodríguez M, D'Antuono AL, Cipolla AL, Elizondo AM, Rossetti CA, Malena R, Méndez CA (2003) Occurrence and characteristics of CS31A antigen-producing *Escherichia coli* in calves with diarrhoea and septicaemia in Argentina. *J Vet Med B* 50: 8-13.
- Fecteau G, Fairbrother JM, Higgins R, Van Metre DC, Pare J, Smith BP, Holmberg CA, Jang S (2001) Virulence factors in *Escherichia coli* isolated from the blood of bacteremic neonatal calves. *Vet Microbiol* 78: 241-249.
- Bertin Y, Girardeau JP, Darfeuille-Michaud A, Martin C (2000) Epidemiological study of pap genes and diarrheagenic or septicemic *Escherichia coli* strains producing CS31A and F17 adhesins and characterization of Pap31A fimbriae. *J Clin Microbiol* 38: 1502-1509.
- Bertin Y, Martin C, Oswald E, Girardeau JP (1996b) Rapid and specific detection of F17-related pilin and adhesion genes in

- diarrheic and septicemic *Escherichia coli* strains by multiplex PCR. J Clin Microbiol 34: 2921-2928.
21. Cid D, Sanz R, Marín I, de Greve H, Ruiz-Santa-Quiteria JA, Amils R, de la Fuente R (1999) Characterization of Nonenterotoxigenic *Escherichia coli* strains producing F17 fimbriae isolated from diarrheic lambs and goat kids. J Clin Microbiol 37: 1370-1375.
 22. Nguyen TD, Vo TT, Vu-Khac H (2011) Virulence factors in *Escherichia coli* isolated from calves with diarrhea in Vietnam. J Vet Sci 12: 159-164.
 23. Bertin Y, Martin C, Girardeau JP, Pohl P, Contrepolis M (1998) Association of genes encoding P fimbriae, CS31A antigen and EAST 1 toxin among CNF1-producing *Escherichia coli* strains from cattle with septicemia and diarrhea. FEMS Microbiol Lett 162: 235-239.
 24. Roosendaal E, Boots M, de Graaf FK (1987) Two novel genes, *fanA* and *fanB*, involved in the biogenesis of K99 fimbriae. Nucleic Acids Res 11: 5973-5984.
 25. Mainil J, Fairbrother J (2014) Pathogenic *Escherichia coli* in domestic mammals and birds. In Morabito S, editor. Pathogenic *Escherichia coli*. Molecular and Cellular Microbiology. Norfolk: Caister Academic Press. 19-44.
 26. Nagy B, Fekete PZ (2005) Enterotoxigenic *Escherichia coli* in veterinary medicine. Int J Med Microbiol 295: 443-454.
 27. Kolenda R, Burdukiewicz M, Schierack P (2015) A systematic review and meta-analysis of the epidemiology of pathogenic *Escherichia coli* of calves and the role of calves as reservoirs for human pathogenic *E. coli*. Front Cell Infect Microbiol 5: 23.
 28. Valat C, Foresta K, Auvray F, Métyera V, Méheutb, T, Polizzia C, Gay E, Haennia M, Oswald E, Madeca JY (2014) Assessment of adhesins as an indicator of pathovar-associated virulence factors in bovine *Escherichia coli*. App Environ Microb 80: 7230-7234.
 29. Ghanbarpour R, Oswald E (2009) Characteristics and virulence genes of *Escherichia coli* isolated from septicemic calves in southeast of Iran. Trop Anim Health Pro 41: 1091-1099.
 30. Andrade GI, Coura FM, Santos EL, Ferreira MG, Galinari GC, Facury Filho EJ, de Carvalho AU, Lage AP, Heinemann MB (2012) Identification of virulence factors by multiplex PCR in *Escherichia coli* isolated from calves in Minas Gerais, Brazil. Trop Anim Health Pro 44: 1783-1790.
 31. Al Mawly J, Grinberg A, Prattley D, Moffat J, French N (2015b) Prevalence of endemic enteropathogens of calves in New Zealand dairy farms. New Zealand Vet J 17: 1-6.
 32. Contrepolis M, Bertin Y, Pohl P, Picard B, Girardeau JP (1998) A study of relationship among F17-a producing enterotoxigenic and non-enterotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic calves. Vet Microbiol 64: 75-81.
 33. Mainil JG, J Gérardin J, Jacquemin E (2000) Identification of the F17 fimbrial subunit- and adhesin-encoding (*f17A* and *f17G*) gene variants in necrotoxicogenic *Escherichia coli* from cattle, pigs and humans. Vet Microbiol 73: 327-335.

Corresponding author

Dr Pablo Zunino
 Departamento de Microbiología
 Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable
 Avenida Italia, 3318 PC: 11600
 Montevideo, Uruguay
 Phone: +598 (2) 4871616
 Fax: +598 (2) 4875548
 Email: pzunino@iibce.edu.uy, pmzunino@gmail.com

Conflict of interests: No conflict of interests is declared.