

Tesina de Grado
Licenciatura en Bioquímica
Facultad de Ciencias
Universidad de la República



Subtipificación de toxinas Shiga en STEC de origen bovino en Uruguay

Bach. Deborah Ernst

Tutor: Dra. Ana Umpiérrez

Co-tutor: Dr. Pablo Zunino

Evaluador externo: Dr. Pablo Smircich

Departamento de Microbiología

Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable

2017

ÍNDICE

<u>RESUMEN</u>	4
<u>INTRODUCCIÓN</u>	5
<u>Actividad ganadera en Uruguay</u>	5
<u>Escherichia coli</u>	6
<u>STEC</u>	7
<u>STEC LEE-Positivas</u>	11
<u>STEC LEE-Negativas</u>	11
<u>Toxinas Shiga</u>	11
<u>Stx1 y Stx2: Profagos</u>	13
<u>Ingreso de la toxina al organismo</u>	15
<u>Síndrome urémico hemolítico (SUH)</u>	17
<u>Stx y serotipos de E. coli</u>	18
<u>Subtipos de toxinas Shiga</u>	18
<u>Stx1</u>	19
<u>Stx1a, c y d</u>	19
<u>Stx2</u>	19
<u>Stx2a, c y d</u>	19
<u>Stx2e</u>	20
<u>Stx2b, f y g</u>	20
<u>HIPÓTESIS</u>	21
<u>OBJETIVO GENERAL</u>	21
<u>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</u>	21
<u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	22
<u>Aislamientos bacterianos</u>	22
<u>Cultivo bacteriano y extracción de ADN</u>	22
<u>Subtipificación de las toxinas Shiga por PCR a tiempo final</u>	22
<u>Confirmación de la identidad de los productos de PCR y análisis de secuencias</u>	23
<u>Stx1</u>	25
<u>Puesta a punto del PCR para la subtipificación de las variantes de Stx1</u>	25
<u>Confirmación de la identidad de los productos de PCR por secuenciación y análisis de resultados</u>	26
<u>Stx2</u>	29
<u>Puesta a punto del PCR para la subtipificación de Stx2</u>	29
<u>Confirmación de la identidad de los productos de PCR por secuenciación y análisis de resultados</u>	31
<u>DISCUSIÓN</u>	33
<u>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	37

TABLA DE ABREVIACIONES

ARNt: Ácido Ribonucleico de Transferencia

CH: Colitis Hemorrágica

EHEC: *Escherichia coli* enterohemorrágica

EPEC: *Escherichia coli* enteropatogénica

Gb3: globotriaosylceramida 3

Gb4: globotetraosylceramida 4

IL-1 β : Interleuquina 1-beta

IL-6: Interleuquina 6

IL-8: Interleuquina 8

LEE: *Locus of enterocyte effacement*

PCR: Polymerase Chain Reaction

STEC: *Escherichia coli* productora de Toxina Shiga

Stx: Toxina Shiga

SUH: Síndrome Urémico Hemolítico

TNF- α : Factor de Necrosis Tumoral Alfa

TSA: Triptosa Soya Agar

UFC: unidades formadoras de colonias

RESUMEN

La producción ganadera bovina, una de las principales actividades económicas en nuestro país, ha experimentado una tendencia hacia sistemas de producción intensivos y semi-intensivos en busca de una mayor rentabilidad. Esto trae consigo una mayor incidencia de enfermedades infectocontagiosas tanto entre animales como hacia los seres humanos. *Escherichia coli* productora de toxinas Shiga (STEC) presenta a los bovinos como su principal reservorio natural y se asocia a enfermedades en los seres humanos transmitidas por la vía fecal-oral. STEC puede causar desde diarreas leves hasta colitis hemorrágica (CH) y síndrome urémico hemolítico (SUH), causado exclusivamente por las toxinas Shiga y pudiendo desencadenar la muerte. El principal factor de virulencia de STEC son las toxinas Shiga 1 (Stx1) y 2 (Stx2), dentro de las cuales se identifican 3 subtipos para Stx1 y 7 para Stx2. Particularmente, los subtipos Stx2a, Stx2c y Stx2d se asocian a enfermedad severa. Por otro lado, Stx2b, Stx2f, Stx2g y Stx1 se asocian a diarreas leves, fiebre, dolores abdominales y Stx2e a enfermedad en cerdos. En Uruguay la incidencia de SUH se estima en 4 o 5 niños cada 100000 menores de 5 años. En ningún caso se ha identificado su origen ya que no existe investigación epidemiológica por no ser de reporte obligatorio al Ministerio de Salud Pública.

El objetivo de este trabajo consistió en subtipificar las toxinas Shiga 1 y 2 de una colección de 32 aislamientos de STEC obtenidos de muestras de heces de terneros mediante la técnica PCR a tiempo final. Asimismo se realizó un árbol filogenético mediante la técnica de *neighbour-joining* para diferenciar ciertos aislamientos cuyas secuencias son muy similares entre sí. Se lograron detectar los genes de los subtipos *stx2a*, *stx1a* y *stx1c*, estos últimos en algunos casos en los mismos aislamientos. No se detectaron las variantes *stx2b*, *stx2c*, *stx2d*, *stx2e*, *stx2f*, *stx2g* y *stx1d*.

Los resultados demuestran la potencialidad de STEC aisladas de bovinos en Uruguay de causar enfermedad severa en el hombre, resaltando el riesgo zoonótico y la necesidad de realizar detección temprana de este patógeno para evitar su propagación.

INTRODUCCIÓN

ACTIVIDAD GANADERA EN URUGUAY

En Uruguay la producción de carne y la industria lechera son importantes fuentes de ingresos económicos debido tanto al consumo interno como a la exportación. Según datos disponibles del Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, en 2016 había en el país más de 12 millones de vacunos (2,7 millones eran terneros), con una producción anual que supera el millón de toneladas de carne y los 2000 millones de litros de leche comercial. Esto refleja la importancia del desarrollo de este sector (Dirección del Área de Estadísticas Agropecuarias, 2016).

En los últimos años, ciertos factores han generado la necesidad de modificar los sistemas de producción con el objetivo de maximizar los recursos disponibles y en busca de una mayor rentabilidad. Entre éstos se encuentra una reducción en las extensiones de campo disponibles para la ganadería debido a un aumento de las destinadas a la forestación y a la agricultura de secano (Dirección del Área de Estadísticas Agropecuarias, 2016). Otro factor relevante es la necesidad de agregar valor a la producción, así como la exigencia de un marco normativo internacional orientado a la producción saludable y sustentable y la demanda creciente de alimentos a nivel mundial.

Tradicionalmente, la producción pecuaria ha sido de tipo extensiva. Sin embargo, dichas condiciones han llevado a los productores a optar por sistemas intensivos, incrementando la producción en el menor lapso de tiempo posible y utilizando el espacio mínimo requerido. Ésto, si bien aumenta la rentabilidad, genera condiciones de estrés en los animales y un aumento en el contagio de enfermedades infecciosas, tanto entre animales como hacia los seres humanos (Mulligan y Doherty 2008; Radostits *et al.* 2007; Renter *et al.* 2003).

Diversos agentes patógenos se han determinado como los causantes de dichas enfermedades infectocontagiosas, siendo uno de los principales el bacilo *Escherichia coli*. En bovinos se ha asociado a leucopenia, hipoglucemia, bajas concentraciones plasmáticas de zinc, fiebre y septicemia (Ballou *et al.* 2011). Además, junto a Rotavirus, especies de *Cryptosporidium* y Coronavirus se estima que son responsables del 75% al 95% de las infecciones en terneros neonatos (Radostits *et al.* 2007).

ESCHERICHIA COLI

Escherichia coli es un bacilo Gram negativo anaerobio facultativo que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* y fue descrito por primera vez en 1885 por un pediatra alemán, Theodor Escherich, a partir de heces de un niño que padecía diarrea (Croxen *et al.* 2013). Es un componente de la microbiota no patogénica predominante en especies de sangre caliente y es considerado el anaerobio facultativo más abundante de la microbiota intestinal humana. Tanto en humanos como en bovinos, *E. coli* coloniza el tracto gastrointestinal horas después del nacimiento a partir de la microbiota materna y ambiental, coexistiendo en condiciones de salud y beneficio mutuo (Kaper *et al.* 2004; Leopold *et al.* 2014; Mainil y Fairbrother 2014). Algunas cepas, sin embargo, han evolucionado a cepas patógenas al adquirir la capacidad de provocar enfermedad. Menos de 2000 genes de los entre 4200 y 5500 que posee *E. coli* en su genoma son conservados entre todas las cepas de la especie (genoma core). Además, estudios del repertorio del pan genoma muestran que comprende 15741 familias génicas, de las cuales sólo el 6% se encuentran representadas en todos los genomas. De esta manera, el genoma variable o accesorio conforma más del 90% del pangenoma y un 80% de un genoma típico (Lukjancenko *et al.* 2010). Las mutaciones, inserciones, deleciones, rearrreglos, duplicación y el flujo continuo de genes localizados en elementos móviles como transposones, integrones, bacteriófagos, plásmidos, elementos de inserción o islas de patogenicidad dan lugar a nuevas combinaciones de genes que aceleran la adaptación de *E. coli* a variados ambientes y estilos de vida, llevando al surgimiento de nuevas cepas más virulentas y con capacidad de causar enfermedad (Muniesa y Schmidt 2014; Scheutz 2014). Dichos elementos móviles pueden ser transferidos desde una cepa patogénica a una no patogénica simplemente mediante el co-cultivo de ambas. Factores de virulencia como toxinas y adhesinas entre otros son codificados en estos elementos génicos accesorios (Kaper *et al.* 2004; Leopold *et al.* 2014; Muniesa y Schmidt, 2014; Scheutz 2014). Algunos de estos factores han persistido exitosamente y las cepas que se han transformado en patógenas se han clasificado en patotipos de *E. coli* (Lukjancenko *et al.* 2010; Scheutz 2014). Estos se definen como grupos de cepas de una única especie que causan una enfermedad común utilizando el mismo set de genes de virulencia (Kaper *et al.* 2004). Asimismo, la totalidad de cepas de *E. coli* se pueden clasificar en comensales, patógenas intestinales ó diarreogénicas, y patógenas extraintestinales. Éstas últimas infectan partes del cuerpo fuera del ambiente intestinal y son responsables por ejemplo de infecciones en el tracto urinario, genital, glándulas mamarias, septicemia y tejido subcutáneo, entre otros (Mainil y Fairbrother 2014).

Actualmente, dentro de las *E. coli* patógenas asociadas a enfermedad diarreogénica (DEC) se reconocen los patotipos: *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteropatogénica (EPEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* de adhesión difusa (DAEC), *E. coli* productora de toxina Shiga (STEC) y dentro de ésta se distinguen las STEC-LEE positivas (también denominadas *E. coli* enterohemorrágicas, EHEC) y LEE-negativas (Kaper *et al.* 2014; Scheutz 2014). LEE (*Locus of Enterocyte Effacement*) es una isla de patogenicidad que codifica las proteínas requeridas para el ensamblaje del sistema de secreción tipo III, que tiene capacidad de inyectar proteínas directamente en el citoplasma de células eucariotas, siendo la intimina una de las proteínas esenciales para la virulencia de STEC (García-Angulo *et al.* 2013).

STEC

La característica más distintiva del patotipo STEC es la expresión de toxinas Shiga. Es un grupo patogénico de *E. coli* con potencial zoonótico definido, siendo los rumiantes y principalmente los bovinos su reservorio natural, aunque pueden aislarse del tracto gastrointestinal de una amplia variedad de animales de sangre caliente (Gyles 2007; Kaper *et al.* 2004). STEC se encuentra habitando principalmente el rumen o intestino, formando parte de la microbiota de animales sanos, y su concentración se hace máxima en la porción recto-anal en la parte distal del intestino grueso (Caprioli *et al.* 2005; Croxen y Finlay 2010; Kaper *et al.* 2004). Su papel patogénico en bovinos es bastante discutido, ya que si bien su colonización tiende a ser asintomática debido a la ausencia del receptor vascular en células eucariotas Gb3 (globotriaosylceramida) (Neill 1997), se ha asociado a episodios de diarrea, especialmente en terneros neonatos (Mainil y Fairbrother 2014; Wieler *et al.* 1998).

Las STEC se propagan por la vía fecal-oral, y tanto bovinos como seres humanos se encuentran expuestos en forma directa mediante el contacto con heces de animales colonizados y en forma indirecta principalmente a través de agua y alimentos contaminados (Daly y Hint 2016). Los niveles de excreción de STEC son mínimos en terneros en lactación, mientras que los máximos se observan inmediatamente luego del destete (Nielsen *et al.* 2002). Un ternero colonizado puede llegar a excretar STEC a niveles tan altos como $1,1 \times 10^7$ UFC/gramo de materia fecal y por un tiempo promedio de 30 días, si bien puede extenderse hasta por un año (Fegan *et al.* 2004; Lim *et al.* 2007; Widiasih *et al.* 2004). Son de gran relevancia los denominados *shedders*, que superan las 10^4 UFC de STEC/gramo de materia fecal, y que a pesar de estar en baja prevalencia son

responsables de la gran mayoría de las STEC presentes en el medio (Chase-Topping *et al.* 2008). La excreción de STEC tiene además una marcada estacionalidad, siendo máxima en los meses calurosos de verano y principios de otoño, y disminuyendo en los meses de invierno (Hancock *et al.* 2001).

En los rodeos su dispersión se ve favorecida bajo condiciones inapropiadas en el almacenamiento del alimento y diseños inadecuados en los comederos y bebederos, en los que pueden persistir viables hasta 4 meses (Persad y LeJeune 2014). Otros factores que pueden aumentar su incidencia son la limpieza con agua de la materia fecal en los callejones (Garber *et al.* 1999), el uso de camas de aserrín con respecto a las de arena (Lejeune y Kauffman 2005) y el movimiento de los animales desde y hacia el tambo, por ejemplo a exhibiciones (Cernicchiaro *et al.* 2009). En estaciones de abundantes lluvias e inundaciones la escorrentía y agua de riego contaminada pueden alcanzar ríos, lagos y pozos privados de agua potable, facilitando su dispersión (Croxen 2013). Se ha demostrado además que la lixiviación de pasturas puede derivar en contaminación subterránea y que STEC puede adherirse a raíces, superficies foliares e incluso a compartimientos internos de las plantas, donde resultan difíciles de remover (Duffy y McCabe 2015; Fairbrother y Nadeau 2006; Gagliardi y Karns 2000; Saldaña *et al.* 2011). De forma similar a su supervivencia ambiental, se ha comprobado que STEC se reproduce y sobrevive durante largos períodos de tiempo en diversas fuentes alimenticias. La carne puede contaminarse durante el sacrificio y procesamiento de animales colonizados, mientras que la leche cruda suele contaminarse por el contacto entre animales y el ambiente (vómitos, vectores, aerosoles) (Lira *et al.* 2004). En forma muy poco frecuente se han detectado los genes de la toxina Shiga en leche de vacas con mastitis, lo que puede significar el comienzo de una infección por STEC en terneros en amamantamiento o bien en personas que consuman leche no pasteurizada y sus derivados provenientes de estos animales (Lira *et al.* 2004). También las hortalizas pueden contaminarse mediante el uso de estiércol como fertilizante o a través de agua de riego contaminada (Ferens y Hovde 2011).

Como se mencionó anteriormente, además de los bovinos existen numerosos animales que pueden portar STEC. Pequeños rumiantes como ovejas y cabras son importantes reservorios de STEC y las pueden adquirir por las mismas vías que los bovinos. Por ejemplo, los ovinos han sido identificados como hospederos de gran relevancia de este patotipo en Australia (Gyles 2007). Sin embargo, el sitio de colonización podría diferir del de los bovinos, viéndose afectada la mucosa

intestinal y todo el intestino distal, y no solo la porción recto-anal (Grauke *et al.* 2002; La Ragione *et al.* 2009).

Los seres humanos también pueden actuar como reservorio de STEC, presentando infección en forma asintomática y promoviendo una rápida propagación del brote, principalmente en el caso de manipuladores de alimentos o personas receptoras especialmente susceptibles a la infección (Beutin y Martin 2012). Se ha demostrado que podrían originar el 30% de los brotes reportados. Además es la vía de contagio del 15 a 20% de los casos en un brote, principalmente por transmisión en el hogar (45%), centros de salud (11%) y agua para uso recreacional (10%) (Pennington 2010; Rangel *et al.* 2005; Snedeker *et al.* 2009). Los niños son el grupo con mayor riesgo de sufrir estas infecciones debido al contacto interpersonal cercano, por poseer un sistema inmune inmaduro, pobre higiene personal y tiempo de evacuación prolongados. También las personas mayores y los inmunocomprometidos corren con mayor riesgo dentro de la población (Rangel *et al.* 2005; Snedeker *et al.* 2009). Un 50% de los brotes en los seres humanos son originados por alimentos contaminados, entre los que prevalecen la carne sin cocer, especialmente carne picada, hamburguesas y salchichas, productos lácteos, algunas frutas y verduras, y la lista se encuentra en continuo crecimiento. La contaminación por sólo 3 a 15 células viables por gramo de carne vacuna y 3 a 4 células viables por gramo de salame ha sido asociada a grandes brotes (Rangel *et al.* 2005). Además, una misma fuente de alimento contaminado puede causar tanto casos esporádicos como grandes brotes (Croxen *et al.* 2013). Las infecciones sintomáticas acaecidas por STEC representan unos 110.000 casos anuales y entre 61 y 541 muertes en Estados Unidos (Fuller 2011; Pacheco y Sperandio 2012). Si bien se han detectado infecciones tanto en países desarrollados como en desarrollo, estos últimos usualmente carecen de diagnósticos clínicos y sistemas de vigilancia que sean efectivos (Croxen *et al.* 2013).

La mayoría de los individuos infectados con STEC logran recuperarse sin mayores complicaciones. Los síntomas pueden variar desde una diarrea acuosa leve a colitis hemorrágica severa (CH), causada por la lisis de las células endoteliales de la mucosa intestinal. En algunos casos comienza como una diarrea acuosa que en 1 ó 2 días evoluciona hacia una diarrea hemorrágica que puede presentarse acompañada de vómitos y dolor abdominal severo (Pacheco y Sperandio 2012). En algunos casos pueden avanzar a complicaciones sistémicas como el síndrome urémico hemolítico (SUH), caracterizado por falla renal aguda, trombocitopenia y

anemia hemolítica. Es una de las principales afecciones a nivel renal en niños menores de 5 años a nivel mundial (Croxen *et al.* 2013).

La relevancia de STEC en la salud pública fue reconocida en 1982, cuando surgieron 2 brotes en Estados Unidos asociados al consumo de hamburguesas de una reconocida cadena de comida rápida contaminadas con *E. coli* O157:H7, un serotipo hasta el momento considerado raro. Este serotipo fue hallado también en un lote de carne sospechoso de haber ocasionado el brote. Los síntomas incluían calambres abdominales, abundante diarrea sanguinolenta sin leucocitos fecales y sin fiebre, con una duración de entre 2 a 9 días. No hubo muertes, complicaciones ni secuelas en ningún caso (Scheutz 2014). Otros ejemplos de importantes brotes son el ocurrido en 1999 debido al consumo de agua contaminada, con 781 personas infectadas, considerado el mayor ocurrido en Estados Unidos hasta el momento (Rangel *et al.* 2005). En 2006, tuvo lugar un brote causado por espinaca contaminada, relevante debido a que el 29% de los pacientes desarrollaron SUH, reflejando un aumento en su incidencia con respecto a brotes anteriores (15-20% de los pacientes) (Pacheco y Sperandio 2012). En 2011 en Alemania el consumo de coles contaminados dio lugar a uno de los mayores brotes de gastroenteritis y SUH reportados hasta el momento, en el que 54 personas fallecieron. Los coles contenían cepas de *E. coli* del serotipo O104:H4, hasta el momento no relacionadas a STEC, que adquirieron la capacidad de expresar las toxinas Shiga (Scheutz 2014). El mismo año, en Japón ocurrió un gran brote provocado por O111:H8 en el que 5 pacientes fallecieron (Terajima *et al.* 2014).

Es importante destacar que actualmente Argentina es considerado el país con mayor incidencia de SUH en niños menores de 5 años (300/400 casos al año) y a la vez es uno de los mayores consumidores de carne bovina a nivel mundial (60kg/persona al año) (Blanco *et al.* 2004). En Uruguay, al igual que Brasil, los casos de SUH y CH no son frecuentes, con una incidencia estimada en 4 o 5 cada 100000 niños (Blanco *et al.* 2004; Pérez *et al.* 2014). Asimismo, trabajos realizados por nuestro grupo de trabajo han detectado una baja presencia de este patotipo en heces de terneros en nuestro país (Umpiérrez *et al.* 2017a).

STEC LEE-Positivas

También denominadas como el patotipo enterohemorrágico (EHEC), las STEC LEE positivas producen lesiones llamadas de adhesión y borrado (A/E) en células del epitelio intestinal mediante la remodelación de la actina del citoesqueleto de la célula hospedera. La habilidad de inducir estos cambios se encuentra codificada en la isla de patogenicidad LEE (Kaper *et al.* 2004; Pacheco y Sperandio 2012). Si bien la expresión de toxina Shiga se considera su factor de virulencia principal, LEE codifica para una serie de proteínas entre las que se destaca la proteína de membrana externa llamada intimina de 94-97 KDa (*eae*) que media la adhesión bacteriana a las células epiteliales entre otras funciones (Croxen y Finlay 2010; Higgins *et al.* 1999). La intimina juega un papel primordial en la persistencia y patogénesis de EHEC en distintas especies animales, tiene un papel sinérgico con Stx y se asocia al 75% de los brotes causados por productos de origen bovino (Cornick *et al.* 2002; Judge *et al.* 2004; Nguyen y Sperandio 2012, Ritchie *et al.* 2003; Saeedi *et al.* 2017). Se estima que apenas entre 50 y 100 UFC de EHEC pueden ser suficientes para causar enfermedad en un individuo sano (Pacheco y Sperandio 2012).

STEC LEE-Negativas

Corresponden a aquellas cepas que carecen de la isla de patogenicidad LEE, por lo tanto no codifican para la intimina. Tienen mecanismos moleculares diferentes a los de las cepas LEE positivas y se han asociado a casos de CH y SUH, siendo uno de los principales el ocurrido en Alemania en 2011, el mayor brote de SUH reportado hasta el momento (Croxen *et al.* 2013).

TOXINAS SHIGA

La toxina Shiga es una exotoxina y es uno de los venenos biológicos más potentes conocidos. Fueron descritas por primera vez por Conradi en 1903, quien las identificó como extractos del bacilo *Shigella dysenteriae*, causante de la disentería bacteriana tipo 1. Conradi reportó que estos extractos eran capaces de paralizar y causar la muerte en conejos (Conradi 1903). Descubrimientos similares y casi al mismo tiempo fueron publicados por Neisser y Shiga independientemente (Neisser y Shiga 1903). Sin embargo, no fue hasta 70 años después de sus primeros reportes que se determinó la actividad endotóxica propia de la toxina Shiga de origen proteico (Stx) (Bridgwater *et al.* 1955; Dubos y Geiger 1946; Strockbine *et al.* 1988). Stx y la toxina Shiga producida por *S. dysenteriae* difieren en solo un aminoácido, por lo que una vez que se obtuvieron toxinas Shiga de *S. dysenteriae* tipo1 purificadas fue posible sintetizar anticuerpos

monoespecíficos en ratones con capacidad para neutralizar también las citotoxinas producidas por algunas cepas de *E. coli*. Es por este motivo que inicialmente se les denominó toxinas tipo Shiga a las producidas por *E. coli* (O'Brien *et al.* 1983; O'Brien y LaVeck 1983). Por otro lado, un grupo de investigadores demostraba que algunas cepas de *E. coli* producen una toxina capaz de destruir células Vero en cultivos, razón por la cual las nombraron verotoxinas (Konowalchuk *et al.* 1977). Finalmente, en 1983 se descubrió que la *E. coli* productora de toxinas Shiga que había causado un brote de CH en Estados Unidos era igual a la verotoxina previamente descrita (Scheutz 2014). De esta manera, en 1983 se llegó a la conclusión de que las verotoxinas y las toxinas Shiga eran en realidad la misma, por lo que puede encontrarse en la bibliografía bajo ambas denominaciones.

Las toxinas Shiga pertenecen al grupo de proteínas AB₅, con una subunidad A con actividad ARN-glicosidasa y 5 unidades B idénticas en la holotoxina madura que median la unión con el receptor globotriaosylceramida (Gb₃) de las células eucariotas (Melton-Celsa, 2014) (Fig. 1). Tienen un peso de 70 kDa y su función es inhibir la síntesis proteica en células eucariotas mediante la formación de un complejo y remoción de un residuo de adenina del ARN ribosómico 28S de la subunidad 60S, modificando así el sitio de acoplamiento del aminoacil ARNt (Juillot y Romer 2014).

Se clasifican en 2 grupos genética e inmunológicamente diferentes: Stx1 (difiere en un aminoácido con la toxina Shiga de *S. dysenteriae* tipo 1) y Stx2, las cuales comparten un 55-60% de identidad aminoacídica (Scheutz *et al.* 2012; Weinsten *et al.* 1989).

Las subunidades A y B están codificadas en un mismo operón, el gen *stxA* está ubicado *upstream* con respecto a *stxB*, y existe una región intergénica corta de 9 a 12 pb. Ambos genes se encuentran localizados entre el gen Q antiterminador y el gen de lisis S (Scheutz *et al.* 2012). Además, dichos genes expresan un péptido señal N-terminal de 66 pares de bases (pb) en la subunidad A de Stx1 y 2, y de 60 y 57 en la subunidad B de Stx1 y Stx2 respectivamente, el cual es responsable de conducir a la toxina al periplasma de la bacteria previo a ser liberada de la célula (Scheutz 2014).

La subunidad A madura de Stx1 consiste de 293 aminoácidos (879 pb), mientras que la cadena A de Stx2 tiene 4 aminoácidos más en el C-terminal (891 pb). Por otra parte, la subunidad B está compuesta de subunidades iguales de 69 aminoácidos en Stx1 (207 pb) y de 71 aminoácidos en Stx2 (213 pb) (Melton-Celsa 2014; Scheutz *et al.* 2012). A y B se unen mediante un poro central en

el pentámero con forma de rosquilla que forman los monómeros de B, donde se inserta la región C terminal de StxA (Julliot y Romer 2014). La subunidad A puede ser clivada en fragmentos A1 y A2 que están unidos por un enlace disulfuro, siendo A1 el fragmento catalíticamente activo. Por otro lado, la subunidad B determina la ubicación celular de las toxinas (Shimizu *et al.* 2007).

En el sitio activo de la toxina Shiga se encuentra el aminoácido ácido glutámico, ubicado en la posición 167 de la cadena aminoacídica A (Hovde *et al.* 1988). Además, hay otros residuos de la subunidad A que contribuyen a la función enzimática de Stx, incluyendo N75, Y77, Y114, R170 y W203 (W202 en Stx2) (Aletrari *et al.* 2011; Deresiewicz *et al.* 1992; Di *et al.* 2011; Hovde *et al.* 1988).

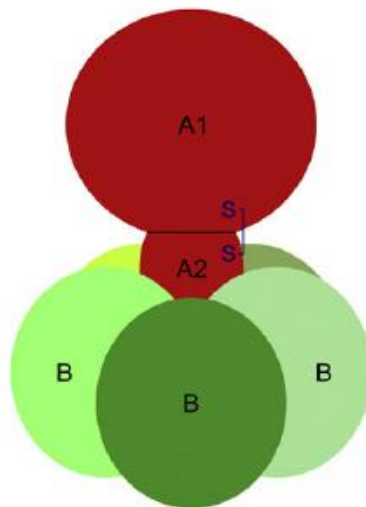


Figura 1. Estructura esquemática de Toxina Shiga. Tomada de Sandvig, 2001.

Stx1 y Stx2: Profagos

Las toxinas Shiga Stx1 y Stx2 están codificadas en el genoma de profagos lamboides templados de ADN doble hebra, los cuales varían entre 42,6 y 63,4 kb de tamaño y se integran al cromosoma bacteriano (Muniesa y Schmidt 2014), excepto un subtipo de Stx2 (Stx2e, descrito más adelante). Estos fagos son elementos altamente móviles, capaces de transmitir los genes *stx* a otros miembros de la familia *Enterobacteriaceae* y promueven la diseminación de STEC, dado que pueden encontrarse como fagos libres en el ambiente, en los alimentos y agua (Imamovic *et al.*

2009). Ambas toxinas están codificadas en fagos diferentes, por lo que en aquellos hospederos infectados por múltiples profagos se puede dar la producción de más de un subtipo de la toxina. Esto también tiene implicancias desde el punto de vista del surgimiento de nuevas variantes, aumentando la probabilidad de recombinación entre secuencias de fagos (Johansen *et al.* 2001). Algunos fagos pueden integrarse al menos 3 veces en un mismo huésped, con eficiencia creciente en cada infección sucesiva (Muniesa y Schmidt 2014). El sitio de inserción del fago en el genoma de *E. coli* depende de la cepa y de la disponibilidad del *locus* preferente para la misma. Estos sitios de inserción son diferentes para cepas LEE positivas y LEE negativas. Para las primeras, los sitios de inserción que han sido reportados son *wrbA*, *yecE*, *torS/T*, *sbcB*, *yehV*, *argW*, *ssrA* y *prfC*. En cepas LEE negativas los sitios de inserción suelen ser diferentes e incluyen *patC*, *yciD*, *ynfH*, *serU*, *mlrA* y *yjbM* (Steyert *et al.* 2012). En este sentido, se ha encontrado una asociación entre la presencia de determinados sitios de inserción dentro de una cepa y su capacidad de causar enfermedad (Shringi *et al.* 2012).

La expresión de la toxina está regulada por la inducción del ciclo lítico del fago, favorecido bajo condiciones que dañan al ADN. En el caso de Stx1 su expresión también está regulada por un promotor que depende de la concentración de hierro y aumenta en condiciones ambientales como temperaturas de 37°C (Muniesa y Schmidt 2014; Pacheco y Sperandio 2012). Por su lado, la expresión de Stx2 se ve favorecida por numerosos factores tales como la acción de algunos antibióticos como quinolonas, ciprofloxacina y mitomicina C que inducen una respuesta celular tipo SOS (Muniesa y Schmidt 2014; Zhang *et al.* 2000). También la luz UV, señales del *quorum sensing*, las hormonas de respuesta al estrés adrenalina y noradrenalina, etanolamina, peróxido de hidrógeno, especies reactivas de oxígeno, temperaturas de 30°C, entre otros, pueden favorecer la expresión de Stx2 (Kendall *et al.* 2012; O'Brien *et al.* 1982; Zhang *et al.* 2000).

Por otro lado, existen factores inhibidores de las toxinas, como son el óxido nítrico y el zinc. Para Stx1, las altas concentraciones de hierro inhiben su transcripción debido a la unión de la proteína Fur, y para Stx2 los probióticos (*in vitro*), altas concentraciones de acetato y temperaturas de 42°C. Si bien el citrato tiene la capacidad de aumentar la expresión de Stx, también provoca una reducción en el número de fagos funcionales (Muniesa y Schmidt 2014).

Ingreso de la toxina al organismo

Como se mencionó anteriormente, las STEC son adquiridas por la vía fecal-oral, y una vez que logran superar las condiciones ambientales del estómago y llegan al intestino, deben competir con otros microorganismos intestinales para poder establecerse y colonizar (Juillot y Romer 2014). Este proceso se ve favorecido por cadenas cortas de ácido graso como acetato, propionato y butirato presentes en el intestino como producto de la fermentación de carbohidratos de la dieta, y catecolaminas que activan la comunicación entre bacterias con las hormonas del hospedero (Karpman y Stahl 2014). A diferencia del género *Shigella* productor de toxina Shiga que coloniza en forma no invasiva, STEC se asocia a las vellosidades del íleon terminal intestinal a través de pili y fimbrias y desde allí secreta toxinas al lumen intestinal (Juillot y Romer 2014; Karpman y Stahl 2014). Estas pueden ser liberadas de 3 formas diferentes: mediante la lisis bacteriana inducida por el fago y su ciclo lítico, por lisis mediada por el sistema inmune del hospedero o por un sistema de secreción a partir de la célula viable de *E. coli* (Donohue-Rolfe y Keusch 1983; Juillot y Romer 2014; Shimizu *et al.* 2009). Las Stx liberadas al lumen se unen a células endoteliales del intestino que expresan el receptor Gb3, formando un complejo receptor Gb3-Stx que ingresa en endosomas tempranos por endocitosis dependiente o independientemente de clatrina. Se dirigen hacia el aparato de Golgi y finalmente al retículo endoplasmático (Fig. 2), donde es reducido el enlace disulfuro que mantiene unidos A1 con el resto de la molécula A2B5 (Fernández *et al.* 2006; Jones *et al.* 2000; Sandvig *et al.* 2010). De esta manera A1 entra al citosol de las células intestinales donde ejerce su actividad citotóxica, removiendo la adenina del ribosoma 28S, y alterando la síntesis proteica (Obrig *et al.* 1987; Spooner y Lord 2012; Tam y Lingwood 2007). La consecuente acumulación de proteínas parcialmente plegadas o defectuosas en el retículo endoplásmico contribuye al estrés del organelo y a la liberación de Ca^{2+} al citosol, promoviendo la activación de la cascada de caspasas que inducen el proceso de apoptosis (Lee *et al.* 2008). Otros efectos del estrés ribotóxico que pueden desencadenar la apoptosis celular son el efecto proinflamatorio, responsable de la activación de citoquinas, principalmente IL-8, IL-6 y TNF- α , quimioquinas, el ingreso de neutrófilos al lumen intestinal, entre otros. Este proceso permite la absorción de la toxina al torrente sanguíneo y su diseminación a otros órganos, principalmente los riñones (Tesh *et al.* 1994; Thorpe *et al.* 2001; Yamasaki *et al.* 1999).

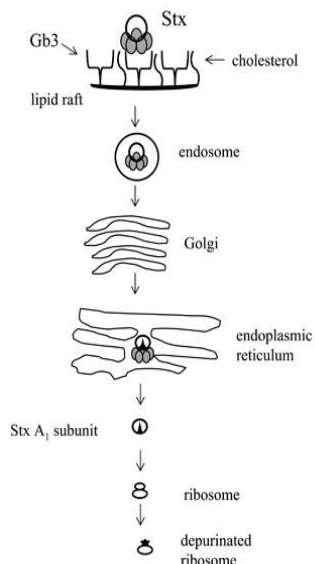


Figura 2. Ilustración de la vía retrograda de ingreso de la toxina a la célula. Extraído de Melton- Celsa, 2015.

Se han propuesto otras vías de ingreso de la toxina a las células intestinales tales como la endocitosis por macropinocitosis y se ha demostrado que tanto Stx1 como Stx2 son capaces de atravesar células colónicas polarizadas T84 que carecen de Gb3 sin alterar la monocapa (Acheson *et al.* 1996; Hurley *et al.* 2001; Philpott *et al.* 1997). También se ha propuesto que las bacterias podrían ingresar por células M intestinales y ser transferidas a los macrófagos que están por debajo, donde pueden sobrevivir y desde allí producir Stx que es liberada al torrente sanguíneo (Karpman y Stahl 2014).

El receptor Gb3, que se encuentra principalmente en células endoteliales (Melton-Celsa 2014), tiene un componente lipídico o ceramida y un trisacárido (Lindberg *et al.* 1987; Lingwood *et al.* 1987) y estudios han demostrado que cuando está ausente en líneas celulares y ratones estos son insensibles a Stx (Acheson *et al.* 1996; Jacewicz *et al.* 1994; Okuda *et al.* 2006). Gb3 se encuentra dentro de *lipid rafts* y se ha reportado que el largo de la cadena de ácidos grasos y el estado de saturación del lípido influyen en la unión de la toxina. También se ha demostrado que niveles altos de colesterol en el *lipid raft* tienden a inhibir la unión de Stx1 pero no de Stx2, lo contrario sucede para la esfingomiélin, que disminuye la unión de Stx2 pero no Stx1 (Tam *et al.* 2008). Se desconoce su función celular normal, sin embargo cuando se encuentra en exceso, como por

ejemplo en personas afectadas con la Enfermedad de Fabry, es responsable de dolencias en los riñones entre otros síntomas (Tarabuso 2011). Se ha demostrado que conejos y seres humanos expresan Gb3 en células endoteliales y neuronas, mientras que en ratones su expresión se ve limitada a neuronas (Ren *et al.* 1999; Utsunomiya *et al.* 2001). Es por esto que los modelos de ratones utilizados para estudiar los efectos de STEC, si bien desarrollan su colonización en el intestino grueso y delgado, no presentan diarrea, lesiones de adhesión y borrado ni ningún otro síntoma gastrointestinal causado por las toxinas (Pacheco y Sperandio 2012). Además, se ha reportado que tanto Stx1 como Stx2 pueden interactuar con el receptor alternativo globotetraosylceramida (Gb4) aunque en forma leve (Nakajima *et al.* 2001).

Síndrome urémico hemolítico (SUH)

Se define como la presencia simultánea de anemia hemolítica no inmune (hematocrito/volumen de células compactadas <30% con evidencia de hemólisis y negativo en prueba de Coombs), trombocitopenia (recuento de plaquetas <150000 mm³) y azotemia (creatinina en concentraciones mayores a las normales para la edad) (Davis *et al.* 2015).

Se desarrolla en entre un 5 y 10% de los casos de infección por STEC y es una de las principales afecciones renales en niños menores de 5 años a nivel mundial (Croxen *et al.* 2013). En la mayoría de los pacientes se requieren transfusiones de eritrocitos debido a la hemólisis y hasta en el 71% de los casos es necesario realizar diálisis debido a alteraciones electrolíticas en SUH aguda (Davis *et al.* 2015). Además se ve un aumento en la síntesis y secreción de citoquinas proinflamatorias y quimioquinas, especialmente IL-6, IL-8, TNF- α e IL-1 β (van Setten *et al.* 1998). Las neuronas y células endoteliales del sistema nervioso central también expresan Gb3 por lo que el sistema nervioso central es un órgano blanco en SUH (Obata *et al.* 2008). Entre un 20 y 50% de los casos de SUH presentan complicaciones neurológicas, de las cuales las más comunes son convulsiones, coma y accidentes cerebrovasculares, si bien estos no resultan letales por sí mismos (Davis *et al.* 2015). Es importante destacar que, sin importar la severidad del daño neurológico, los pacientes pueden recuperarse completamente en semanas o meses (Braune *et al.* 2013; Loos *et al.* 2012; Magnus *et al.* 2012). Se estima que entre el 2% y el 7% de los pacientes que desarrollan SUH fallecen de esta enfermedad (Croxen *et al.* 2013; Eppinger y Cebula 2015). Asimismo, está ampliamente aceptado que Stx2 tiene mayor potencial de provocar SUH que Stx1 (Fuller 2011).

Stx y serotipos de *E. coli*

En 1940 Kauffmann propuso un esquema de serotipificación de *E. coli*, según el cual se distinguen las cepas por su lipopolisacárido (O) y el flagelo (H). El serotipo O157:H7 es el principal serotipo asociado a SUH post-diarrea, si bien se han identificado STEC pertenecientes a más de 100 serotipos diferentes (Beutin y Fach 2014). Otros serotipos de relevancia que han sido vinculados recientemente a grandes brotes de SUH son O26, O45, O103, O111, O121, y O145 (Brusa *et al.* 2017; Hickey *et al.* 2011; Jajarmi *et al.* 2017; Rivas *et al.* 2006; Tarr *et al.* 1990). En particular, el sistema A/E presente en las STEC LEE positivas es tanto un mecanismo típico de dichos serotipos como del serogrupo O157:H7 (Beutin y Fach 2014).

Algunos autores han propuesto clasificar a los serotipos en seropatotipos según la ocurrencia con la que se han reportado en brotes o enfermedad esporádica, la severidad con que lo hacen y su asociación con SUH. Estos grupos se clasifican en letras, desde la "A" hasta la "E" (Karmali 2003), siendo el grupo A el que abarca los más virulentos; O157:H7 y O157:NM (*non-motil*), hasta el serotipo E, que se compone de al menos 14 serotipos animales que no han sido implicados en enfermedad en humanos (Karmali 2003). Sin embargo, con el surgimiento de nuevos brotes y una vez que hubo suficiente evidencia, el Panel de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria sobre riesgos biológicos determinó que la patogenicidad no puede ser excluida ni confirmada para un serotipo o serogrupo de STEC (Scheutz 2014).

Subtipos de toxinas Shiga

Las toxinas Stx1 y Stx2 se han clasificado en diferentes subtipos. El grupo Stx1 es más conservado y cuenta con 3 subtipos, *a*, *c* y *d*, mientras que Stx2 es más heterogéneo y se han distinguido 7 subtipos, *a*, *b*, *c*, *d*, *e*, *f* y *g*. Los subtipos tienen hibridación cruzada de sus genes bajo condiciones de alta astringencia, pero pueden exhibir diferencias significativas en actividad biológica y/o inmunoreactividad, unión a receptor y capacidad de ser activados por elastasa en el mucus intestinal (Melton-Celsa 2014; Scheutz 2014). Además, se han descrito variantes dentro de cada subtipo, 107 reconocidas al año 2014, incluyendo 9 variantes de *stx1a*, 4 de *stx1c*, y 1 de *stx1d*, y 21 de *stx2a*, 16 de *stx2b*, 18 de *stx2c*, 18 de *stx2d*, 14 *stx2e*, 2 *stx2f* y 4 *stx2g* (Scheutz 2014). Stx2a y Stx1a son los más comúnmente asociados a enfermedad dentro de sus respectivos grupos.

Stx1

Stx1a, c y d

Hasta el momento sólo el subtipo Stx1a ha sido reportado en casos de enfermedad severa en humanos, aunque no se ha determinado una asociación significativa con SUH (Melton-Celsa, 2014). En los casos excepcionales en los que se ha asociado la presencia del gen *stx1* y SUH se encontraron factores agravantes como el suministro de antibióticos, falla renal aguda, doble infección con presencia de gen *stx2* y *eae*, entre otros (Scheutz 2014). Stx1c y Stx1d raramente están asociados a enfermedad en seres humanos, y cuando han sido aislados de pacientes con STEC presentan síntomas leves (Melton-Celsa 2014).

Stx2

Stx2a, c y d

Stx2c y principalmente Stx2a y Stx2d se asocian a SUH y normalmente tienen consecuencias clínicas más severas que Stx1 (Bergan *et al.* 2012; Gyles 2007). Se ha reportado que Stx2d resulta tan tóxica como Stx2a al ser inyectada en animales y que un cambio en un aminoácido del sitio de unión de la subunidad B de Stx2d vuelve a la toxina tan potente para las células Vero como Stx2a (Lindgren *et al.* 1994). Estudios *in vitro* también las han reportado más potentes que Stx2b y Stx2c (Fuller 2011). Por otro lado, Stx2c se ha manifestado potencialmente peligrosa cuando se encuentra en combinación con Stx2a (Ogura *et al.* 2015; Scheutz 2014).

Como se mencionó anteriormente, la mayoría de los brotes de SUH están dados por cepas STEC O157:H7 que contienen el gen de la toxina *stx2a*, acompañado o no por el gen *stx2c* (Scheutz 2014). La fuerte asociación entre SUH y Stx2a se reportó por primera vez en el brote causado por coles contaminadas en Alemania en 2011 (Frank *et al.* 2011). El agente etiológico de este brote fue una cepa O104:H4, un serotipo nunca antes asociado a los genes *stx* aunque vinculado a diarrea no sanguinolenta. Esta cepa al adquirir el fago codificante de Stx2a obtuvo la capacidad de causar numerosos casos de CH y SUH, dejando en evidencia el papel fundamental de Stx en el desarrollo de enfermedad severa (Scheutz 2014).

Por otro lado el subtipo Stx2d ha sido clasificado en base a su activación por elastasa, la cual remueve 2 aminoácidos (GE) del extremo C-terminal de la subunidad A (Scheutz 2012). Los cultivos con cepas que expresan Stx2d activable al tratarse con elastasa aumentan la citotoxicidad

en células Vero, y se cree que la capacidad de Stx2d de causar enfermedad severa en humanos y ratones está dada por su presencia en el intestino (Melton-Celsa *et al.* 1996). Stx2d activable se ha asociado con la manifestación más seria de infección por STEC, SUH, y se ha reportado que sólo está presente en STEC LEE negativas (Bielaszewska *et al.* 2006).

Stx2e

Stx2e está asociado a gastroenteritis en forma leve en humanos mientras que es el subtipo más frecuente en porcinos. En éstos es capaz de causar edema, una enfermedad que puede desencadenar desórdenes neurológicos fatales (Beutin *et al.* 2008). En 2 ocasiones se reportó haber sido aislado de pacientes humanos con SUH, aunque estudios ulteriores demostraron que uno de ellos probablemente se encontraba coinfectado con otro subtipo de toxina Shiga, y que el otro presentaba un sistema inmunológico debilitado (Scheutz 2014).

La subunidad B de Stx2e tiene 9 aminoácidos diferentes al subtipo Stx2a y carece de los 2 aminoácidos C-terminales. Estos cambios alteran la preferencia por la unión a receptor. Stx2e es el único subtipo que interactúa preferentemente con Gb4, antes que con Gb3 (DeGrandis *et al.* 1989; Samuel *et al.* 1990). Esto lo convierte en el único subtipo de Stx2 que carece de la capacidad de infectar células HeLa, ya que éstas no presentan del mencionado receptor (Paton y Paton 1998).

Stx2b, f y g

Stx2b raramente se asocia a enfermedad en humanos, y si lo hace es en forma leve, mientras que Stx2f y Stx2g colonizan diversos animales sin causarles enfermedad (Pierard *et al.* 1998; Stephan y Hoelzle 2000). Si bien se ha visto en aumento la detección de la variante Stx2f en STEC aisladas de seres humanos, estos son muy escasos por lo cual no hay suficiente información acerca de su patogenicidad ni de prevalencia en los seres humanos (Moxley 2000; Persson *et al.* 2011; Prager *et al.* 2009). Debido a su restringida diversidad, algunos autores sugieren que este subtipo ha surgido recientemente (Prager *et al.* 2011).

HIPÓTESIS

Existe en Uruguay un potencial riesgo zoonótico asociado a la presencia de variantes de STEC de origen bovino altamente virulentas.

OBJETIVO GENERAL

Subtipificar los genes que codifican a las toxinas Shiga 1 y 2 de una colección de aislamientos del patotipo STEC asociadas a diarrea neonatal en terneros.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

-Puesta a punto de la técnica de PCR convencional para la detección de las variantes *stx1a*, *stx1c* y *stx1d* de *stx1*.

-Obtener las secuencias de los amplicones generados.

-Confirmar identidad de las secuencias obtenidas mediante herramientas bioinformáticas.

-Puesta a punto de la técnica de PCR convencional para la detección de las variantes *stx2a*, *stx2b*, *stx2c*, *stx2d*, *stx2e*, *stx2f* y *stx2g* de *stx2*.

-Obtener las secuencias de los amplicones generados.

-Confirmar identidad de las secuencias obtenidas mediante herramientas bioinformáticas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamientos bacterianos

En el presente trabajo se emplearon 32 aislamientos de *E. coli* de los patotipos STEC LEE-positivos y STEC LEE-negativos. Dichos aislamientos fueron obtenidos en el marco de dos proyectos de investigación sobre *E. coli* asociada a la Diarrea Neonatal en Terneros llevados adelante por nuestro equipo de trabajo en el Departamento de Microbiología del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable. En los mencionados proyectos se caracterizaron molecularmente más de 2000 aislamientos de *E. coli* provenientes de aproximadamente 230 bovinos. Del total, sólo 8 animales presentaron aislamientos positivos para STEC. Uno de estos animales estaba sano, 5 presentaban síntomas de diarrea y los 2 restantes también tenían síntomas de diarrea pero estaban muertos al momento del muestreo. Los aislamientos fueron obtenidos a partir de materia fecal de los animales, excepto en los animales muertos, en los cuales se aisló *E. coli* a partir de las necropsias (muestras de íleon y bazo). Los establecimientos ganaderos en los cuales se detectó STEC se encuentran ubicados en los departamentos de Colonia, Artigas y San José y fueron aislados entre 2014 y 2016 (Umpiérrez *et al.* 2017a).

Cultivo bacteriano y extracción de ADN

Todos los aislamientos utilizados en este trabajo se encontraban almacenados a -80°C en medio Caldo Soya Triptosa (TSB) con 15% de glicerol esteril, en el Cepario del Departamento de Microbiología del IIBCE. Cuando se requirió, los aislamientos se cultivaron en placas de Tripteína Soya Agar (TSA) durante 18 a 24 horas, a 37°C.

La extracción de ADN se realizó por lisis térmica. Para ello se tomaron 2 o 3 colonias por cada aislamiento y se realizó una suspensión de bacterias en 200ul de H₂O destilada. Cada suspensión se calentó a 100°C por 10 minutos en baño de agua y se centrifugó por 10 minutos a 12000 rpm. El ADN bacteriano total se colectó del sobrenadante, se cuantificó en NanoDrop (Thermo Scientific) y se almacenó a -20°C hasta su uso.

Subtipificación de las toxinas Shiga por PCR a tiempo final

Basándonos en el trabajo realizado por Scheutz y colaboradores (2012), se puso a punto en el laboratorio la técnica de PCR convencional para la subtipificación de las toxinas. Se evaluó la presencia de los genes de los subtipos *stx1a*, *stx1c* y *stx1d* y de los subtipos *stx2a*, *stx2b*, *stx2c*,

stx2d, *stx2e*, *stx2f* y *stx2g*. Para todos los casos se amplificaron fragmentos de los genes de las toxinas que permitían diferenciarlos entre sí (Tabla 1). En el caso de las variantes de *stx1* los cebadores amplifican una región de la subunidad A del gen *stx1A*, mientras que para determinar las variantes de *stx2*, los cebadores amplifican un fragmento de la subunidad A del gen *stx2A*, otro de la subunidad B del gen *stx2B* y la región intergénica entre ambos genes (Scheutz *et al.* 2012).

Confirmación de la identidad de los productos de PCR y análisis de secuencias

La correcta amplificación de los genes se verificó corriendo una alícuota de cada producto de PCR en geles de agarosa (1%) teñidos con GelRed (Biotum) y luego observados bajo luz UV. Dado que era la primera vez que se identifican las toxinas Shiga a nivel subtipo en nuestro laboratorio, no contábamos con muestras que pudieran ser utilizadas como controles positivos. Por lo tanto, aquellos aislamientos que presentaron una banda del tamaño esperado en los geles se consideraron presuntamente positivos y fueron secuenciados en el servicio brindado por Macrogen (Corea).

Una vez obtenidas las secuencias de los genes amplificados, una a partir del cebador *Forward* y otra del *Reverse* para cada subtipo, se elaboró una secuencia consenso entre ambas con el programa bioinformático Bioedit.

Se estableció el porcentaje de identidad con secuencias de cepas de referencia para cada subtipo establecidas por Scheutz y colaboradores en su trabajo (2012), todas disponibles en la base de datos pública NCBI (National Center for Biotechnology Information). El porcentaje de identidad fue obtenido mediante la herramienta disponible en el programa de alineamiento de secuencias BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). De esta manera fueron clasificados los aislamientos a partir del punto de corte establecido para *Stx1* y *Stx2*. Para el caso de los subtipos *stx2a*, *stx2c* y *stx2d* cuyas secuencias nucleotídicas son muy similares entre sí, luego de la amplificación de cada subtipo por PCR se procedió a secuenciar parcialmente el operón *Stx2AB*. Los cebadores empleados se detallan en la Tabla 1 y amplifican un fragmento de 627pb que comprende un fragmento de la subunidad A del gen *stx2A*, otro de la subunidad B del gen *stx2B* y la región intergénica entre ambos genes (Persson *et al.* 2007). Con las secuencias obtenidas y con las de las cepas de referencia de cada variante (*Stx2a*: [X07865](#), *Stx2c*: [L11079](#), *Stx2d*: [DQ059012](#)) se realizó un árbol filogenético para visualizar diferentes *clusters*. El mismo fue realizado mediante el método de *neighbour-joining* acorde a lo planteado en el trabajo de Scheutz y colaboradores (2012) y con un *bootstrap* de 1000 en el programa bioinformático MEGA 6.0.

Tabla 1. Cebadores y condiciones de PCR utilizados para la amplificación de los subtipos de las toxinas Shiga.

Cebadores	Secuencia 5'---3'	Posición	Tamaño (pb)	Mezcla de reacción (25 µl)	Ciclado	Referencia
<u>stx1</u>						
stx1aF	CCTTTCCAGGTACAACAGCGGTT	362–384	478	0,4mM dNTPs, 3mM MgCl ₂ , cebadores: 1,6µM de stx1a, 0,8µM de stx1c y stx1d, 5ng/µl ADN, 1U de Taq Polimerasa y 1X de <i>buffer</i> de la enzima		
stx1aR	GGAAACTCATCAGATGCCATTCTGG	815–839				
stx1cF	CCTTTCTGGTACAACGCGGTT	362–384	252			
stx1cR	CAAGTGTGTACGAAATCCCCTCTGA	588–613				
stx1dF	CAGTTAATGCGATTGCTAAGGAGTTTACC	50-78	203			
stx1dR	CTCTTCTCTGGTTCTAACCCCATGATA	225–252				
<u>Stx2</u>						
stx2aF	GCGATACTGRGBACTGTGGCC	754–774	349	0,4mM dNTPs, 4mM MgCl ₂ , 0,32µM de cada cebador 5ng/µl ADN, 1U de Taq Polimerasa y 1X de <i>buffer</i> de la enzima	8 min a 95°C, [50 seg a 95°C, 40 seg a 66°C , 1 min a 72°C] x 35, y 9 min de extensión a 72°C	Scheutz <i>et al.</i> 2012
stx2aR	CCGKCAACCTTCACTGTAAATGTG	1079–1102				
stx2bF	AAATATGAAGAAGATATTTGTAGCGGC	968–994	251			
stx2bR	CAGCAAATCCTGAACCTGACG	1198–1,218				
stx2cF	GAAAGTCACAGTTTTTATATAACCGGGTA	926–955	177			
stx2cR	CCGGCCACYTTTACTGTGAATGTA	1079–1102				
Stx2dF	AAARTCACAGTCTTTATATAACCGGGTG	927–955	280			
stx2dR	GCCTGATGCACAGGTAAGGAC	1184–1206				
stx2eF	CGGAGTATCGGGGAGAGGC	695–713	411			
stx2eR	CTTCCTGACACCTTCACAGTAAAGGT	1080–1105				
stx2fF	TGGGCGTCATTCACTGGTTG	451–475	424			
stx2fR	TAATGGCCGCCCTGTCTCC	856–874				
stx2gF	CACCGGGTAGTTATATTTCTGTGGATATC	203–231	573			
stx2gR	GATGGCAATTCAGAATAACCGCT	771-93				
<u>Operón stx2AB</u>						
stx2F	GGCACTGTCTGAAACTGCTCCTGT	606-629	627			Persson <i>et al.</i> 2007
stx2R	ATTAAGTGCACCTTCAGCAAATCC	1209-1232				

RESULTADOS

Stx1

Puesta a punto del PCR para la subtipificación de las variantes de Stx1

Se puso a punto la técnica de PCR convencional para amplificar los genes de los subtipos *stx1*: *stx1a*, *stx1c* y *stx1d*. Se obtuvieron bandas de tamaño esperado para *stx1a* de 478pb y *stx1c* de 252pb, sin bandas inespecíficas (Fig. 3). No se detectó el gen *stx1d* en ningún aislamiento. El gen *stx1a* se detectó en todos los aislamientos *stx1+* (n=26), mientras que *stx1c* se detectó en 15 aislamientos *stx1a+*. No se detectaron aislamientos que presentaran sólo el gen *stx1c*.

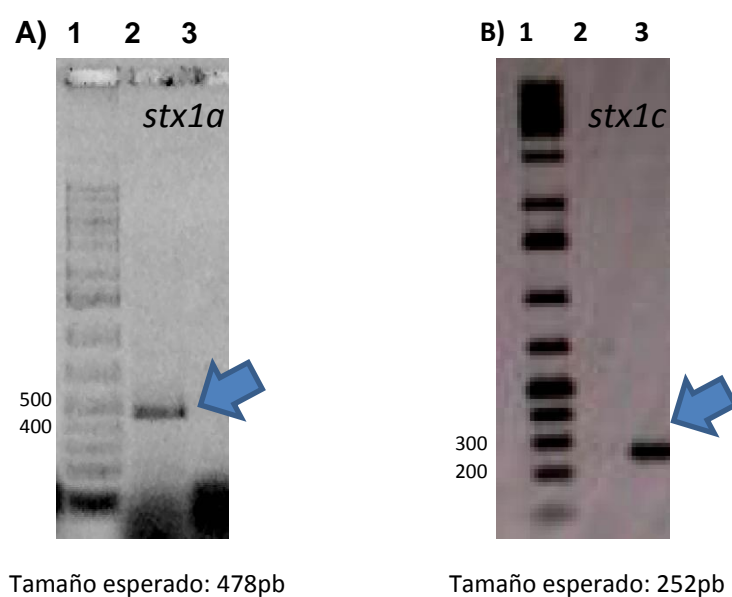


Figura 3. Productos de amplificación correspondientes a los genes *stx1a* y *stx1c*. Carril 1 de cada gel: estándar 1kb Plus (Thermo Scientific). A) Carril 2: aislamiento *stx1a+*. Carril 3: control negativo. B) Carril 2: control negativo. Carril 3: aislamiento *stx1c+*. Flechas: productos de PCR. Los tamaños esperados se especifican debajo de cada imagen.

Confirmación de la identidad de los productos de PCR por secuenciación y análisis de resultados.

De acuerdo a lo establecido por Scheutz y colaboradores (2012), para confirmar la presencia de un gen de un subtipo *stx1* en un aislamiento su secuencia nucleotídica debe coincidir en más del 95,89% con una secuencia de referencia seleccionada para cada caso. Se secuenciaron 2 aislamientos *stx1+* seleccionados aleatoriamente en representación de la totalidad, dado que las corridas electroforéticas fueron iguales entre sí. Las secuencias consenso generadas se compararon con las de referencia con el programa BLAST y se obtuvieron así los resultados plasmados en la tabla 2.

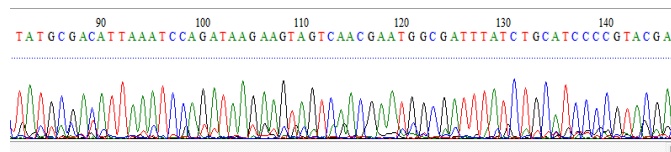


Figura 4. Resultado ilustrativo de uno de los cromatogramas obtenidos de la secuenciación de las variantes *stx1* (MACROGEN, método de Sanger).

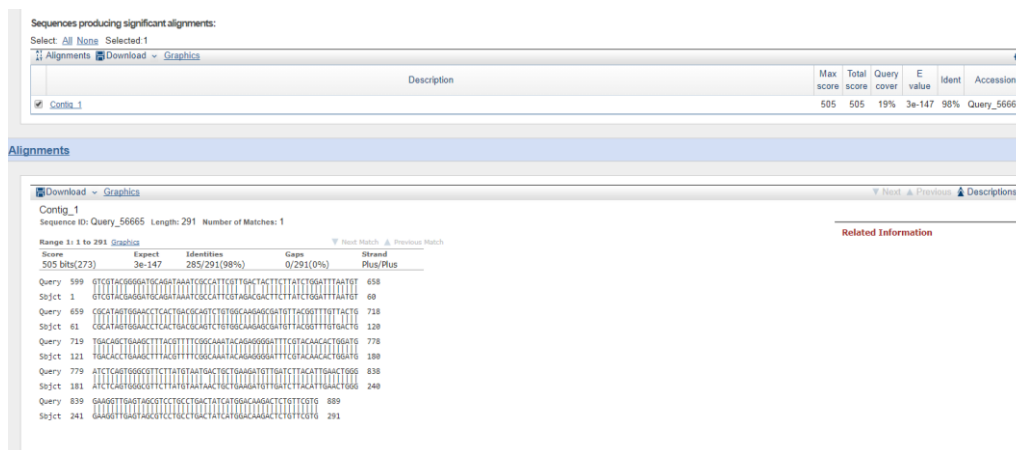


Figura 5. Ejemplo de porcentaje de identidad entre la secuencia obtenida para la variante *stx1c* de un aislamiento y la secuencia de la cepa de referencia. Herramienta: BLAST.

Tabla 2. Subtipificación Stx1. Establecimientos muestreados, sintomatología de cada animal, aislamientos positivos para los genes *stx1a* y *stx1c* y patotipo correspondiente.

Departamento	Establ.	Estado del animal	Aislamiento	Subtipos			<i>eae</i> (*)	Patotipo			
				a	c	d					
Colonia	1	Sano	AC3.1	1	1	0	1	STEC LEE-positiva			
			AC3.2	1	1	0	1				
			AC3.10	1	0	0	1				
San José	2	Enfermo	AD1.2	1	0	0	0	STEC LEE-negativa			
			AD1.5	1	1	0	0				
			AD1.6	1	0	0	0				
			AD1.7	1	1	0	0				
			AD1.9	1	1	0	0				
		Enfermo	AD3.2	1	1	0	1	STEC LEE-positiva			
			AD3.4	1	1	0	1				
			AD3.5	1	1	0	1				
			AD3.7	1	1	0	1				
			AD3.9	1	0	0	1				
		Enfermo	AD3.10	1	1	0	1	STEC LEE-positiva			
			AD7.2	1	0	0	0				
			AD7.4	1	0	0	0				
			AD7.5	1	0	0	0				
			AD7.8	1	0	0	0				
Artigas	3	Enfermo	74.2	1	0	0	0	STEC LEE-negativa			
			Colonia	4	Necropsiado (íleon)	16.16	1	1	0	1	STEC LEE-positiva
						18.16	1	1	0	1	
19.16	1	1				0	1				
20.16	1	1				0	1				
			21.16	1	1	0	1				

*Analizado previamente. Umpiérrez *et al.* 2017b.

Tabla 3. Prevalencia de los genes de cada subtipo *stx1+* por aislamientos respecto a la sintomatología de los animales muestreados. n= número total de aislamientos *stx1+*.

	Nº aislamientos (n=26)			Prevalencia (%)		
	Enfermos	Sanos	Total	Enfermos	Sanos	Total
<i>stx1a</i>	23	3	26	88	12	100
<i>stx1c</i>	13	2	15	87	13	58
<i>stx1d</i>	0	0	0	0	0	0

La prevalencia del gen *stx1a* fue del 100% en los aislamientos analizados, el gen *stx1c* fue detectado en el 58% de los mismos y el gen *stx1d* en el 0% (Tabla 3). Mientras que *stx1c* sólo fue hallado en aislamientos positivos también para *stx1a*, *stx1a* fue hallado en forma individual en el 42% de los aislamientos. La prevalencia de *stx1a* en forma individual y junto a *stx1c* fue similar tanto en aislamientos provenientes de animales enfermos como los del animal sano. Los muestreos fueron realizados durante el año 2016, excepto el establecimiento ubicado en Artigas, que corresponde al año 2014. De esta manera, a tiempos cercanos pero en distintos establecimientos y departamentos fue detectada la presencia de STEC, tanto LEE-positivas como negativas.

Stx2**Puesta a punto del PCR para la subtipificación de Stx2**

Se puso a punto la técnica de PCR convencional para amplificar las variantes de Stx2. Se obtuvieron bandas de los tamaños esperados para los subtipos *stx2a*, de 349pb, *stx2c* de 177pb, *stx2d* de 280pb y *stx2e* de 411pb sin bandas inespecíficas (Fig. 6). De los 6 aislamientos *stx2+*, 1 presentó banda de tamaño esperado únicamente para el subtipo *stx2a*. Dos aislamientos presentaron sólo para *stx2e*. Por otro lado, 1 aislamiento presentó bandas correspondientes a los subtipos *stx2a*, *stx2c* y *stx2d* en simultáneo y 2 aislamientos presentaron bandas para los subtipos *stx2a*, *stx2c*, *stx2d* y *stx2e* simultáneamente. No se obtuvieron bandas para los genes *stx2b*, *stx2f* y *stx2g* en ninguno de los aislamientos evaluados.

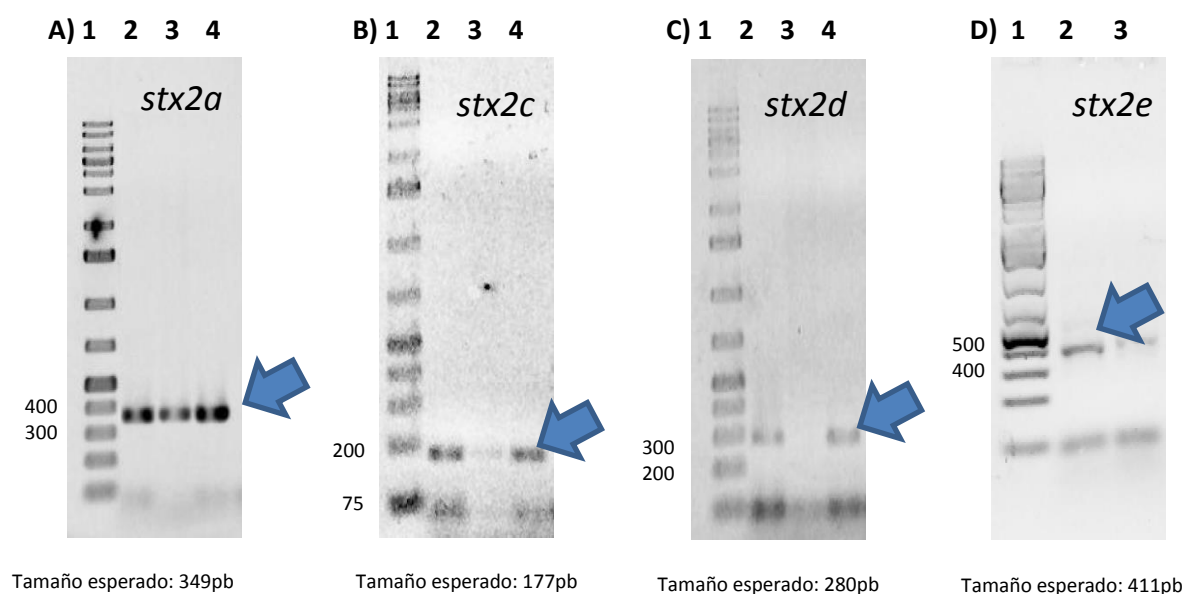


Figura 6. Productos de amplificación de los genes *stx2a*, *stx2c*, *stx2d* y *stx2e*. Carril 1 en todos los geles: 1kb Plus (Thermo Scientific). A) carriles 2, 3 y 4: muestras *stx2a+*. B) carril 2 y 4: muestras *stx2c+*. Carril 3: muestra *stx2c-*. D) Carril 2 y 3: muestras *stx2e+*. Flechas: bandas de tamaño esperado. Los tamaños esperados (pb) se especifican debajo de cada imagen.

Se seleccionó el producto de amplificación de un aislamiento positivo para cada subtipo y fueron secuenciados en MacroGen (Corea). A partir de las secuencias obtenidas fue posible

determinar que el producto amplificado por cebadores *stx2e* no correspondió a una toxina Shiga, lo cual se atribuye a una amplificación inespecífica. Por otro lado, las secuencias consenso de *stx2a*, *stx2c* y *stx2d* presentaron porcentajes de identidad muy altos tanto con su propia secuencia de referencia como con las referencias de los otros dos subtipos (Fig. 7). Si bien el punto de corte establecido para secuencias *stx2+* es 82.93%, estos 3 subtipos son una excepción por ser muy similares entre sí. Para confirmar la identidad se amplificó parcialmente el operón *Stx2AB* de dichos aislamientos tal como sugieren Scheutz y colaboradores en su trabajo (2012).

Secuencias consenso	Secuencias de referencia			
	% identidad	<i>stx2a</i>	<i>stx2c</i>	<i>stx2d</i>
<i>stx2a</i>	99,2	98,3	96,7	
<i>stx2c</i>	100	97,1	98,6	
<i>stx2d</i>	100	92,9	91,6	

Figura 7. Porcentajes de identidad obtenidos con BLAST. Columna izquierda: secuencia consenso obtenida a partir de un aislamiento positivo para cada subtipo. Fila superior: secuencias de referencia propuestas por Scheutz y colaboradores (2012).

Confirmación de la identidad de los productos de PCR por secuenciación y análisis de resultados.

Una vez obtenidas las secuencias de los operones de los aislamientos *stx2a+*, *stx2c+* y *stx2d+* se realizó un árbol filogenético junto a las secuencias de referencia y se confirmó que todos los aislamientos son positivos para el subtipo *stx2a* (Fig. 8).

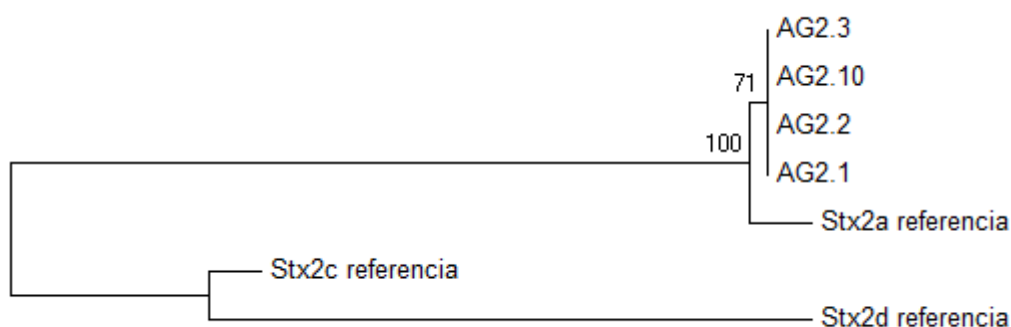


Figura 8. Árbol filogenético con los genes de las variantes Stx2a, Stx2c y Stx2d de referencia y de los 4 aislamientos STEC analizados. Obtenido mediante análisis de *neighbour-joining* con 1000 réplicas de *bootstrap*.

Tabla 4. Subtipificación de Stx2. Localización del establecimiento muestreado, nº de animales y estado de salud, aislamientos positivos para cada subtipo y patotipo de los mismos.

Depto	Establ.	Animal	Estado	Aislamiento	Subtipos							<i>eae</i> (*)	Patotipo
					a	b	c	d	e	f	g		
				AG2.1	1	0	0	0	0	0	0	1	
Colonia	5	1	Enfermo	AG2.2	1	0	0	0	0	0	0	1	STEC LEE-positiva
				AG2.3	1	0	0	0	0	0	0	1	
				AG2.10	1	0	0	0	0	0	0	1	

*Analizado previamente. Umpiérrez *et al.* 2017b.

Tabla 5. Prevalencia de los genes de cada subtipo en aislamientos *stx2+* respecto al estado de salud de los animales muestreados. Todos los aislamientos corresponden al mismo animal. n= número total de aislamientos *stx2+*.

	Nº aislamientos (n=4)			Prevalencia (%)		
	Enfermos	Sanos	Total	Enfermos	Sanos	Total
<i>stx2a</i>	4	0	4	100	0	100
<i>stx2b</i>	0	0	0	0	0	0
<i>stx2c</i>	0	0	0	0	0	0
<i>stx2d</i>	0	0	0	0	0	0
<i>stx2e</i>	0	0	0	0	0	0
<i>stx2f</i>	0	0	0	0	0	0
<i>stx2g</i>	0	0	0	0	0	0

En el árbol filogenético se observa un *cluster* que incluye todos los aislamientos STEC *stx2+* junto con la secuencia de referencia para el subtipo Stx2a y otro *cluster* que agrupa las secuencias de referencia de Stx2c y Stx2d. Es posible entonces confirmar la presencia del gen que codifica para el subtipo Stx2a en todos los aislamientos y se descarta la presencia de los subtipos Stx2c y Stx2d (Tablas 4 y 5). Los aislamientos considerados presuntamente positivos para el gen *stx2e* y que fueron descartados como tales fueron obtenidos de un animal diferente al de las muestras mencionadas, por lo tanto todos los aislamientos confirmados corresponden a un mismo animal enfermo con síntomas de diarrea. Asimismo, todos los aislamientos positivos lo son también para el gen de la intimina, analizado en trabajos anteriores en nuestro laboratorio (Umpiérrez *et al.* 2017a) por lo cual son LEE-positivos. Vale destacar que si bien el establecimiento está ubicado en el departamento de Colonia no corresponde con ninguno de los que presentaron resultados positivos para *stx1*.

DISCUSIÓN

La severidad de las infecciones causadas por STEC está determinada tanto por factores del huésped como del microorganismo. Ciertos grupos dentro de la población como los niños, ancianos e inmunocomprometidos tienen mayor susceptibilidad a las mismas, si bien los factores exactos que influyen en la edad no son aún claros (Fuller *et al.* 2011). Por otro lado, entre los aspectos determinados por el microorganismo se destaca la presencia de otros genes de virulencia en *E. coli*, como el gen de la intimina que puede tener efecto sinérgico con las toxinas Shiga. Además, altos niveles de expresión de la toxina están asociados a mayor probabilidad de desarrollar enfermedad severa (Fuller *et al.* 2011; Gyles 2007). Finalmente, los subtipos de las toxinas Shiga cumplen un papel fundamental en este aspecto, con ciertos subtipos asociados a alta y otros a baja potencia de la toxina. Mientras que los subtipos de Stx1 y los subtipos Stx2b, Stx2e, Stx2f y Stx2g de Stx2 están mayormente vinculados a baja toxicidad en los seres humanos, existen subtipos con altos niveles de toxicidad: Stx2a, Stx2c y Stx2d, los cuales se asocian a CH y SUH (Akiyama *et al.* 2017). Sumado a esto, podría existir una relación sinérgica o antagónica entre los diferentes subtipos (Fuller *et al.* 2011).

En el presente trabajo se analizaron 32 aislamientos en los que previamente fueron detectados genes que codifican para las toxinas Shiga (26 *stx1+* y 6 *stx2+*). La mayoría de los animales de los cuales se aislaron presentaban síntomas de diarrea (6/7), mientras que solo uno de ellos se encontraba sano (Tablas 2, 3, 4 y 5). Se detectó la presencia de 3 de los 10 genes que codifican para subtipos de las toxinas Shiga, *stx1a*, *stx1c* y *stx2a*.

En el caso de *stx1* se encontró una prevalencia del 100% del subtipo *stx1a*. Estos resultados son comparables con trabajos publicados recientemente por investigadores en Estados Unidos, Irán y Japón. Dichos trabajos reportan la prevalencia de este subtipo en muestras extraídas de bovinos y los autores proponen que la variante *stx1a* sería la más prevalente dentro de las *stx1* en bovinos (Akiyama *et al.* 2017; Jajarmi *et al.* 2017; Shridhar *et al.* 2017). Asimismo, en el trabajo realizado en Estados Unidos también fue detectado *stx1c*. La presencia de *stx1a* y *stx1c* simultáneamente ha sido previamente reportada en bovinos, si bien *stx1c* se ha asociado mayormente a ovinos (Brett *et al.* 2003). Por otro lado, un estudio reciente realizado en Argentina encontró en alta prevalencia el subtipo *stx1a* en muestras de carne obtenidas en

carnicerías en Buenos Aires, aunque en la mayoría de los casos los aislamientos también presentaban además otros genes de toxinas, principalmente *stx2a* (Brusa *et al.* 2017).

Con respecto a la sintomatología de los animales, 2 de los 3 aislamientos provenientes del animal sano fueron positivos para el subtipo *stx1a* y *stx1c* simultáneamente y también para el gen de la intimina *eae*, mientras que el tercero fue negativo para *sxt1c*. Aunque se requeriría contar con un mayor número de muestras, los datos obtenidos reflejan que sólo evaluando la presencia o ausencia de los genes de virulencia analizados no es suficiente para determinar que se desarrollen signos clínicos en los animales que los portan. Podrían estar involucrados otros factores en la sintomatología, tales como otros factores de virulencia, factores ambientales, estado nutricional, entre otros. Al respecto, otros trabajos han demostrado que Stx1 no está asociada a apoptosis celular en terneros y que las células colónicas son resistentes al efecto modulador y citotóxico de las toxinas (Menge *et al.* 2006; Stamm *et al.* 2008). En cuanto a los seres humanos, en nuestro país se han reportado casos de SUH asociados a Stx1 junto con intimina y otros genes de virulencia, si bien dichos aislamientos no fueron caracterizados a nivel subtipo (Perez *et al.* 2014). En general es poco frecuente la asociación entre Stx1a y SUH, y se ha manifestado que cuando ocurre probablemente estén influyendo otros factores agravantes. Por su lado, Stx1c y Stx1d normalmente están asociados a enfermedad leve, por lo cual la presencia de Stx1 no estaría representando un peligro mayor para la salud pública (Melton-Celsa 2014).

Con respecto a Stx2, Scheutz y colaboradores (2012) proponen un punto de corte de 82,93% en el porcentaje de identidad frente a una cepa de referencia para confirmar la presencia de un gen de un determinado subtipo. Sin embargo, Stx2a, Stx2c y Stx2d deben ser confirmados mediante la realización de un árbol filogenético por tener secuencias muy similares entre sí. En el presente trabajo se detectó el subtipo *stx2a* con 100% de prevalencia en cepas LEE positivas (Tablas 4 y 5). Estudios recientes a nivel regional, así como en Japón y Corea han reportado la prevalencia de este gen en muestras provenientes de bovinos (Akiyama *et al.* 2017; Bursa *et al.* 2017; Dong *et al.* 2017). Stx2a se encuentra mayormente asociado a cepas de *E. coli* O157:H7, y en muestras de bovinos se ha demostrado que es el factor determinante para que dichas cepas sean virulentas o no (Shringi *et al.* 2012). Sumado a esto, se ha manifestado potencialmente peligrosa la combinación con Stx2c (Ogura *et al.* 2015; Scheutz 2014). Con respecto a los seres

humanos, es el patotipo más ampliamente asociado a enfermedad severa y especialmente SUH, siendo responsable del mayor brote reportado al momento (Scheutz 2014). En Uruguay también se ha asociado a SUH, y de hecho la primera cepa STEC O157:H7 aislada en nuestro país a partir de un paciente correspondía a la variante Stx2a (Gadea *et al.* 2004). Se han identificado otros casos de SUH en Uruguay causados por cepas *stx2+* y *eae+*, pero no se ha especificado el subtipo de las cepas que los provocaron (Pérez *et al.* 2014).

En Uruguay la incidencia de SUH se estima en 4 o 5 cada 100000 niños menores de 5 años, mientras que en Argentina esta cifra se eleva a 12,2 cada 100000, una de las más altas a nivel mundial (Blanco *et al.* 2004; Pérez *et al.* 2014). En los trabajos publicados sobre SUH en Uruguay no pudieron establecerse los alimentos o las vías por las que fueron adquiridas las cepas tóxicas. Esto podría explicarse por el hecho de que los casos de SUH no son de reporte obligatorio ante el Ministerio de Salud Pública y por lo tanto no hay investigación epidemiológica al respecto (Pérez *et al.* 2014). Por otro lado, las bajas incidencias de SUH en nuestro país corroboran la baja detección de STEC en muestras bovinas registradas por nuestro grupo de trabajo en heces de terneros (Umpiérrez *et al.* 2017a). Si bien SUH es endémica en algunos países de la región, sólo en Argentina, Chile, Bolivia y Paraguay deben reportarse obligatoriamente (Rivas *et al.* 2014). Mientras tanto algunos países de Europa, Estados Unidos, Australia y Canadá entre otros, tienen sistemas de vigilancia de enfermedades que les permite obtener datos sobre la incidencia de infecciones por STEC (Rivas *et al.* 2014).

La identificación temprana e internación de los pacientes infectados con STEC es crítica para evitar el riesgo de casos secundarios y diagnósticos erróneos. Además, permite iniciar la fluidoterapia intravenosa lo más pronto posible, que hasta el momento consiste en el tratamiento más efectivo para limitar el desarrollo de SUH (Ake *et al.* 2005; Hickey *et al.* 2011; Werber *et al.* 2008). No se ha desarrollado aun un tratamiento 100% efectivo, incluso en países desarrollados. La administración de antibióticos en etapas tempranas de SUH ha demostrado que en el mejor de los casos tienen efecto neutro y que tiende a aumentar el riesgo de que se desarrolle enfermedad severa, al igual que agentes antidiarreicos (Davis *et al.* 2015). Algunas estrategias alternativas son la utilización de inhibidores del *quorum sensing*, las vacunas, el uso de probióticos, y la utilización de receptores análogos a Stx y piocinas, entre

otros (Nguyen *et al.* 2012; Pacheco y Sperandio 2012). También se ha sugerido agregar un paso final de descontaminación en la elaboración de productos cárnicos de origen bovino, por ejemplo mediante irradiación gamma. Hasta el momento la intervención más exitosa han sido 2 vacunas anti *E. coli* O157:H7 que se suministran a los bovinos (Pacheco y Sperandio 2012). Si bien éstas han logrado reducir las prevalencias de bovinos *shedders* portadores de STEC O157:H7, en condiciones naturales su eficacia no es clara y probablemente depende de cómo los productos son administrados en los animales (Smith *et al.* 2009). Para mejorar su eficacia sería necesario realizar más ensayos en condiciones que se aproximen mejor a las reales de los tambos (Smith *et al.* 2009).

Los resultados obtenidos en este trabajo permiten confirmar la presencia de subtipos de STEC con capacidad de causar enfermedad leve y severa en nuestro país. Se destaca la necesidad de la implementación de un sistema de vigilancia a nivel nacional, así como medidas de control y prevención de este patógeno en el ambiente de los rodeos, sus alrededores y en la cadena de producción de alimentos. Sumado a esto, se destaca la importancia de promover buenas prácticas de higiene en la sociedad que permitan reducir la propagación de SUH y otras enfermedades.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acheson DW, Moore R, De Breucker S, Lincicome L, Jacewicz M, Skutelsky E, Keusch GT.** 1996. Translocation of Shiga toxin across polarized intestinal cells in tissue culture. *J Infect Immun* 64:3294-3300
- Ake JA, Jelacic S, Ciol MA, Watkins SL, Murray KF, Christie DL, Klein EJ, Tarr PI.** 2005. Relative nephroprotection during *Escherichia coli* O157:H7 infections: association with intravenous volume expansion. *Pediatrics* 115:673–680
- Akiyama Y, Futai H, Saito E, Ogita K, Sakae H, Fukunaga M, Tsuji H, Chikahira M, Iguchi A.** 2017. Shiga Toxin Subtypes and Virulence Genes in *Escherichia coli* isolated from Cattle. *Jpn J Infect Dis* 70:181–185
- Aletrari MO, McKibbin C, Williams H, Pawar V, Pietroni P, Lord JM, Flitsch SL, Whitehead R, Swanton E, High S, Spooner RA.** 2011. Eeyarestatin 1 interferes with both retrograde and anterograde intracellular trafficking pathways. *PLoS One* 6:22713
- Ballou MA, Cobba CJ, Hulbert LE, Carroll JA.** 2011. Effects of intravenous *Escherichia coli* dose on the pathophysiological response of colostrum-fed Jersey calves. *Vet Immunol Immunopathol* 141:76–83
- Baranzoni GM, Fratamico PM, Gangiredla J, Patel I, Bagi LK, Delannoy S, Fach P, Boccia F, Anastasio A, Pepe T.** 2016. Characterization of shiga toxin subtypes and virulence genes in Porcine shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Front Microbiol* 7:574
- Bartels CJM, Holzhauser 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. *Prev Vet Med* 93:162-169
- Bergan J, Dyve Lingelem AB, Simm R, Skotland T, Sandvig K.** 2012. Shiga toxins. *Toxicon* 60:1085-1107
- Beutin L, Kruger U, Krause G, Miko A, Martin A.** 2008. Evaluation of major types of Shiga toxin 2e-producing *Escherichia coli* bacteria present in food, pigs, and the environment as potential pathogens for humans. *Appl Environ Microbiol* 74:4806–4816
- Beutin L, Martin A.** 2012. Outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) O104:H4 infection in Germany causes a paradigm shift with regard to human pathogenicity of STEC strains. *J Food Prot* 75:408-418
- Beutin L, Fach P.** 2014. Detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from nonhuman sources and strain typing. *Microbiol Spectrum* 2:EHEC-0001-2013
- Bielaszewska M, Friedrich AW, Aldick T, Schurk- Bulgrin R, Karch H.** 2006. Shiga toxin activatable by intestinal mucus in *Escherichia coli* isolated from humans: predictor for a severe clinical outcome. *Clin Infect Dis* 43:1160-1167
- Blanco M, Padola ML, Krüger A, Sanz M, Blanco JE, González EA, Dahbi G, Mora A, Bernárdez MI.** 2004. Virulence genes and intimin types of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle and beef products in Argentina. *Int Microbiol* 7:269-276

Braune SA, Wichmann D, von Heinz MC, Nierhaus A, Becker H, Meyer TN, Meyer GP, Muller-Schulz M, Fricke J, de Weerth A, Hoepker WW, Fiehler J, Magnus T, Gerloff C, Panzer U, Stahl RA, Wegscheider K, Kluge S. 2013. Clinical features of critically ill patients with Shiga toxin induced hemolytic uremic syndrome. *Crit Care Med* 41:1702–1710

Brett KN, Ramachandran V, Hornitzky MA, Bettelheim KA, Walker MJ, Djordjevic SP. 2003. stx1c is the Most Common Shiga Toxin 1 Subtype among Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolates from Sheep but Not among Isolates from Cattle. *J Clin Microbiol* 41:926–936

Bridgwater FA, Morgan RS, Rowson KE, Wright GP. 1955. The neurotoxin of *Shigella shigae*: morphological and functional lesions produced in the central nervous system of rabbits. *Br J Exp Pathol* 36:447-453

Brusa V, Costa M, Londero A, Leotta GA, Galli L. 2017. Characterization and Molecular Subtyping of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Strains in Butcher Shops. *Foodborne Pathog Dis* 14:253-259

Caprioli A, Morabito S, Brùgere H, Oswald E. 2005. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. *Vet Res* 36:289-311

Cernicchiaro N, Pearl DL, Ghimire S, Gyles CL, Johnson RP, LeJeune JT, Ziebell K, McEwen SA. 2009. Risk factors associated with *Escherichia coli* O157:H7 in Ontario beef cow-calf operations. *Prev Vet Med* 92:106-115

Chandler WL, Jelacic S, Boster DR, Ciol MA, Williams GD, Watkins SL, Igarashi T, Tarr PI. 2002. Prothrombotic coagulation abnormalities preceding the hemolytic-uremic syndrome. *N Engl J Med* 346:23–32

Chase-Topping M, Gally D, Low C, Matthews L, Woolhouse M. 2008. Super-shedding and the link between human infection and livestock carriage of *Escherichia coli* O157. *Nat Rev Microbiol* 6:904-12

Cho Y II, Yoon KJ. 2014. An overview of calf diarrhea infectious etiology, diagnosis, and intervention. *J Vet Sci* 15:1-17

Conradi H. 1903. Über lösliche, durch asptische Autolyse erhaltene Giftstoffe von Ruhr- und Typhus-Bazillen. *Dtsch Med Wochenschr* 29:26-28

Cornick NA, Booher SL, Moon HW. 2002. Intimin facilitates colonization by *Escherichia coli* O157:H7 in adult ruminants. *Infect Immun* 70:2704–2707

Croxen MA, Finlay BB. 2010. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat Rev Microbiol* 8:26-38

Croxen MA, Law RJ, Scholz R, Keeney KM, Wlodarska M., Finlay BB. 2013. Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 26:822–880

Daly RF, Hill NT. 2016. Characterizing the Role of Animal Exposures in Cryptosporidiosis and Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* Infections: South Dakota, 2012. *Zoonoses Public Health* 63:467-76

Davis TK, Van De Kar NCAJ, Tarr PI. 2014. Shiga toxin/ verocytotoxin-producing *Escherichia coli* infections: practical clinical perspectives. *Microbiol Spectrum* 2:EHEC-0025-2014

DeGrandis S, Law H, Brunton J, Gyles C, Lingwood CA. 1989. Globotetraosylceramide is recognized by the pig edema disease toxin. *J Biol Chem* 264:12520-12525

Deresiewicz RL, Calderwood SB, Robertus JD, Collier RJ. 1992. Mutations affecting the activity of the Shiga-like toxin I A-chain. *Biochemistry* 31:3272-3280

Di R, Kyu E, Shete V, Saidasan H, Kahn PC, Tumer NE. 2011. Identification of amino acids critical for the cytotoxicity of Shiga toxin and 2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Toxicon* 57:525-539

Dong HJ, Lee S, Kim W, An JU, Kim J, Kim D, Cho S. 2017. Prevalence, virulence potential, and pulsed-field gel electrophoresis profiling of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from cattle. *Gut Pathogens* 9:22

Donohue-Rolfe A, Keusch GT. 1983. *Shigella dysenteriae* 1 cytotoxin: periplasmic protein releasable by polymyxin B and osmotic shock. *Infect. Immun* 39:270-274

Dubos RJ, Geiger JW. 1946. Preparation and properties of Shiga toxin and toxoid. *J Exp Med* 84:143-156

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

Eppinger M, Cebula TA. 2015. Future perspectives, applications and challenges of genomic epidemiology studies for food-borne pathogens: A case study of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) of the O157:H7 serotype. *Gut Microbes* 6:194–201

Ethelberg S, Olsen KEP, Scheutz F, Jensen C, Schiellerup P, Engberg J, Petersen AM, Olesen B, Gerner Schmidt P, Molbak K. 2004. Virulence factors for hemolytic uremic syndrome, Denmark. *Emerg Infect Dis* 10:842-847

Fairbrother JM, Nadeau E. 2006. *Escherichia coli*: on-farm contamination of animals. *Rev Sci Tech* 25:555-569

Fegan N, Vanderlinde P, Higgs G, Desmarchelier P. 2004. The prevalence and concentration of *Escherichia coli* O157 in faeces of cattle from different production systems at slaughter. *J Appl Microbiol* 97:362-370

Ferens WA, Hovde CJ. 2011. *Escherichia coli* O157:H7: animal reservoirs and sources of human infection. *Foodborne Pathog Dis* 8:465–487

Fernandez GC, Lopez MF, Gomez SA, Ramos MV, Bentancor LV, Fernandez-Brando RJ, Landoni VI, Dran GI, Meiss R, Isturiz MA, Palermo MS. 2006. Relevance of neutrophils in the murine model of haemolytic uremic syndrome: mechanisms involved in Shiga toxin type 2- induced neutrophiliae *Clin Exp Immunol* 146:76–84

Frank C, Werber D, Cramer JO, Askar M, Faber M, an der Heiden A, Bernard H, Fruth A, Prager R, Spode A, Wadl M, Zoufaly A, Jordan S, Kemper MJ, Follin P, Muller L, King LA, Rosner B, Buchholz

- U, Stark K, Krause G.** 2011. Epidemic profile of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 outbreak in Germany. *N Engl J Med* 365:1771-1780
- Friedrich AW, Bielaszewska M, Zhang WL, Pulz M, Kuczius T.** 2002. *Escherichia coli* harboring Shiga toxin 2 gene variants: frequency and association with clinical symptoms. *J Infect Dis* 185:74–84
- Fuller CA, Pellino CA, Flagler MJ, Strasser JE, Weiss AA.** 2011. Shiga toxin subtypes display dramatic differences in potency. *Infect Immun* 79:1329-1337
- Gadea MdP, Varela G, Bernad , M, Sirok A, Mota MI, Sabelli R, Grotiuz G, Schelotto F, Chinen I, Chillemi G, Rivas M.** 2004. Primer aislamiento en Uruguay de *Escherichia coli* productora de toxina Shiga del serotipo O157:H7 en una ni a con síndrome urémico hemolítico. *Rev M d Urug* 20:79-81
- Gagliardi JV, Karns JS.** 2000. Leaching of *Escherichia coli* O157:H7 in diverse soils under various agricultural management practices. *Appl Environ Microbiol* 66:877-883
- Garber L, Wells S, Schroeder-Tucker L, Ferris K.** 1999. Factors associated with fecal shedding of verotoxin-producing *Escherichia coli* O157 on dairy farms. *J Food Prot* 62:307-312
- Garcia-Angulo VA, Kalita A, Torres AG.** 2013. Advances in the development of enterohemorrhagic *Escherichia coli* vaccines using murine models of infection. *Vaccine* 31:3229–3235
- Ge S, Hertel B, Emden SH, Beneke J, Menne J, Haller H, von Vietinghoff S.** 2012. Microparticle generation and leucocyte death in Shiga toxin-mediated HUS. *Nephrol Dial Transplant* 27:2768–2775
- Grauke LJ, Kudva IT, Yoon JW, Hunt CW, Williams CJ, Hovde CJ.** 2002. Gastrointestinal tract location of *Escherichia coli* O157:H7 in ruminants. *Appl Environ Microbiol* 68:2269-2277
- Guessous F, Marcinkiewicz M, Polanowska-Grabowska R, Kongkhum S, Heatherly D, Obrig T, Gear AR.** 2005. Shiga toxin 2 and lipopolysaccharide induce human microvascular endothelial cells to release chemokines and factors that stimulate platelet function. *Infect Immun* 73:8306–8316
- Gyles CL.** 2007. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. *J Anim Sci* 85:45-62
- Hancock D, Basser T, Lejeune J, Davis M, Rice D.** 2001. The control of VTEC in the animal reservoir. *Int J Food Microbiol* 66:71-78
- Hickey CA, Beattie TJ, Cowieson J, Miyashita Y, Strife CF, Frem JC, Peterson JM, Butani L, Jones DP, Havens PL, Patel HP, Wong CS, Andreoli SP, Rothbaum RJ, Beck AM, Tarr PI.** 2011. Early volume expansion during diarrhea and relative nephroprotection during subsequent hemolytic uremic syndrome. *Arch Pediatr Adolesc Med* 165:884–889
- 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
- Hovde CJ, Calderwood SB, Mekalanos JJ, Collier RJ.** 1988. Evidence that glutamic acid 167 is an active-site residue of Shiga-like toxin I. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:2568-2572
- Howard JG.** 1955. Observations on the intoxication produced in mice and rabbits by the neurotoxin of *Shigella shigae*. *Br J Exp Pathol* 36:439-446

Hurley BP, Jacewicz M, Thorpe CM, Lincicome LL, King AJ, Keusch GT, Acheson DW. 1999. Shiga toxins 1 and 2 translocate differently across polarized intestinal epithelial cells. *Infect Immun* 67:6670–6677

Hurley BP, Thorpe CM, Acheson DW. 2001. Shiga toxin translocation across intestinal epithelial cells is enhanced by neutrophil transmigration. *Infect Immun* 69:6148-6155

Imamovic L, Jofre J, Schmidt H, Serra-Moreno R, Muniesa M. 2009. Phage-mediated Shiga toxin 2 gene transfer in food and water. *Appl Environ Microbiol* 75:1764-1768

Jacewicz MS, Mobassaleh M, Gross SK, Balasubramanian KA, Danie PF, Raghavan S, McCluer RH, Keusch GT. 1994. Pathogenesis of Shigella diarrhea: XVII. A mammalian cell membrane glycolipid, Gb3, is required but not sufficient to confer sensitivity to Shiga toxin. *J Infect Dis* 169:538-546

Jajarmi M, Ali Imani Fooladi A, Askari Badouei M, Ahmadi A. 2017. Virulence genes, Shiga toxin subtypes, major O-serogroups, and phylogenetic background of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from cattle in Iran. *Microb Pathog* 109:274-279

Johansen BK, Wasteson Y, Granum PE, Brynstad S. 2001. Mosaic structure of Shiga-Toxin-2-encoding phages isolated from *Escherichia coli* O157:H7 indicates frequent gene exchange between lambdoid phage genomes. *Microbiol* 147:1929-1936

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. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 278:811-819

Judge NA, Mason HS, O'Brien AD. 2004. Plant cell-based intimin vaccine given orally to mice primed with intimin reduces time of *Escherichia coli* O157:H7 shedding in feces. *Infect Immun* 72:168–175

Juillot S, Romer W. 2014. Shiga Toxins. En: *Pathogenic Escherichia coli*, Molecular and Cellular Microbiology. Morabito, S. Caister Academic Press. Norfolk, UK, capt 5, pp: 79-101

Kaper JB, Nataro JP, Mobley HLT. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 2:123-140

Karmali MA, Mascarenhas M, Shen S, Ziebell K, Johnson S, Reid-Smith R, Isaac Renton J, Clark C, Rahn K, Kaper JB. 2003. Association of genomic O island 122 of *Escherichia coli* EDL 933 with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* seropathotypes that are linked to epidemics and/or serious disease. *J Clin Microbiol* 41:4930-4940

Karpman D, Ståhl A. 2014. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* pathogenesis and the host response. *Microbiol Spectrum* 2:EHEC-0009-2013

Kendall MM, Gruber CC, Parker CT, Sperandio V. 2012. Ethanolamine controls expression of genes encoding components involved in interkingdom signaling and virulence in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *M Bio* 3:1-10

Konowalchuk J, Speirs JI, Stavric S. 1977. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect Immun* 18:775-779

Kulkarni AA, Fuller C, Korman H, Weiss AA, Iyer SS. 2010. Glycan encapsulated gold nanoparticles selectively inhibit Shiga toxins 1 and 2. *Bioconj Chem* 21:1486-1493

La Ragione RM, Best A, Woodward MJ, Wales AD. 2009. *Escherichia coli* O157:H7 colonization in small domestic ruminants. *FEMS Microbiol Rev* 33:394-410

Lee SY, Lee MS, Cherla RP, Tesh VL. 2008. Shiga toxin 1 induces apoptosis through the endoplasmic reticulum stress response in human monocytic cells. *Cell Microbiol* 10:770-780

Lejeune JT, Kauffman MD. 2005. Effect of sand and sawdust bedding materials on the fecal prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy cows. *Appl Environ Microbiol* 71:326-330

Leopold SR, Dobrindt U., Karch H, Mellmann A. 2014. Genomic plasticity and the emergence of new pathogenic *Escherichia coli*. En: *Pathogenic Escherichia coli*, Molecular and Cellular Microbiology. Morabito, S. Caister Academic Press. Norfolk, UK, Capt 3, pp: 46-55

Lim JY, Li J, Sheng H, Besser TE, Potter K, Hovde CJ. 2007. *Escherichia coli* O157:H7 colonization at the rectoanal junction of long-duration culture-positive cattle. *Appl Environ Microbiol* 73:1380-1382

Lindberg AA, Brown JE, Stromberg N, Westling-Ryd M, Schultz JE, Karlsson KA.1987. Identification of the carbohydrate receptor for Shiga toxin produced by *Shigella dysenteriae* type 1. *J Biol Chem* 262:1779-1785

Lindgren SW, Samuel JE, Schmitt CK, O'Brien AD. 1994. The specific activities of Shiga-like toxin type II (SLT-II) and SLT-II related toxins of enterohemorrhagic *Escherichia coli* differ when measured by Vero cell cytotoxicity but not by mouse lethality. *Infect Immun* 62:623-631

Lingwood CA, Law H, Richardson S, Petric M, Brunton JL, De Grandis S, Karmali M. 1987. Glycolipid binding of purified and recombinant *Escherichia coli* produced verotoxin in vitro. *J Biol Chem* 262:8834-8839

Lira WM, Macedo C, Marin JM. 2004. The incidence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in cattle with mastitis in Brazil. *J Appl Microbiol* 97:861-866

Loos S, Ahlenstiel T, Kranz B, Staude H, Pape L, Hartel C, Vester U, Buchtala L, Benz K, Hoppe B, Beringer O, Krause M, Muller D, Pohl M, Lemke J, Hillebrand G, Kreuzer M, Konig J, Wigger M, Konrad M, Haffner D, Oh J, Kemper MJ. 2012. An outbreak of Shiga toxinproducing *Escherichia coli* O104:H4 hemolytic uremic syndrome in Germany: presentation and short-term outcome in children. *Clin Infect Dis* 55:753–759

Lukjancenko O, Wassenaar TM, Ussery DW. 2010. Comparison of 61 sequenced *Escherichia coli* genomes. *Microb Ecol* 60:708-720

Magnus T, Rother J, Simova O, Meier-Cillien M, Repenthin J, Moller F, Gbadamosi J, Panzer U, Wengenroth M, Hagel C, Kluge S, Stahl RK, Wegscheider K, Urban P, Eckert B, Glatzel M, Fiehler J, Gerloff C. 2012. The neurological syndrome in adults during the 2011 northern German *E. coli* serotype O104:H4 outbreak. *Brain* 135:1850–1859

Mainil JG, Fairbrother J. 2014. Pathogenic *Escherichia coli* in domestic mammals and birds. En: Morabito S (ed) *Pathogenic Escherichia coli*. Molecular and Cellular Microbiology. Caister Academic Press, UK, pp 19-44

- Melton-Celsa AR, Darnell SC, O'Brien AD.** 1996. Activation of Shiga-like toxins by mouse and human intestinal mucus correlates with virulence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O91:H21 isolates in orally infected, streptomycin-treated mice. *Infect Immun* 64:1569-1576
- Melton-Celsa AR.** 2014. Shiga Toxin (Stx) Classification, Structure, and Function. *Microbiol Spectr* 2:EHEC-0024-2013
- Menge C, Eisenberg T, Stamm I, Baljer G.** 2006. Comparison of binding and effects of *Escherichia coli* Shiga toxin 1 on bovine and ovine granulocytes. *Vet Immunol Immunopathol* 113:392-403
- Moxley RA.** 2000. Edema disease. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 16:175-185
- Mulligan FJ, Doherty ML.** 2008. Production disease of the transition cow. *Vet J* 176:3-9
- Muniesa M, Schmidt H,** 2014. Shiga Toxin-encoding Phages: Multifunctional Gene Ferries. En: *Pathogenic Escherichia coli, Molecular and Cellular Microbiology*. Morabito, S. Caister Academic Press. Norfolk, UK, Capt 4, pp: 57-77
- Nakajima H, Kiyokawa N, Katagiri YU, Taguchi T, Suzuki T, Sekino T, Mimori K, Ebata T, Saito M, Nakao H, Takeda T, Fujimoto J.** 2001. Kinetic analysis of binding between Shiga toxin and receptor glycolipid Gb3Cer by surface plasmon resonance. *J Biol Chem* 276:42915-42922
- Neill MA.** 1997. Overview of verotoxigenic *Escherichia coli*. *J Food Prot* 60:1444-1446
- Neisser M, Shiga K.** 1903. Ueber freie Receptoren von Typhus- und Dysenteriae- Bazillen und ueber das Dysenteriae Toxin. *Dtsch Med Wochenschr* 29:61-62
- Nguyen Y, Sperandio V.** 2012. Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) pathogenesis. *Front Cell Infect Microbiol* 2:90
- Nielsen EM, Tegtmeyer C, Andersen HJ, Gronbaek C, Andersen JS.** 2002. Influence of age, sex and herd characteristics on the occurrence of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in Danish dairy farms. *Vet Microbiol* 88:245-257
- O'Brien AD, LaVeck GD.** 1983. Purification and characterization of a *Shigella dysenteriae* 1- like toxin produced by *Escherichia coli*. *Infect Immun* 40:675-683
- O'Brien AD, Lively TA, Chen ME, Rothman SW, Formal SB.** 1983. *Escherichia coli* O157:H7 strains associated with haemorrhagic colitis in the United States produce a *Shigella dysenteriae* 1 (Shiga) like cytotoxin. *Lancet* 1:702
- O'Brien AD, LaVeck GD, Thompson MR, Formal SB.** 1982. Production of *Shigella dysenteriae* type 1- like cytotoxin by *Escherichia coli*. *J Infect Dis* 146:763-769
- Obata F, Tohyama K, Bonev AD, Kolling GL, Keepers TR, Gross LK, Nelson MT, Sato S, Obrig TG.** 2008. Shiga toxin 2 affects the central nervous system through receptor globotriaosylceramide localized to neurons. *J Infect Dis* 198:1398-1406
- Obrig TG, Moran TP, Brown JE.** 1987. The mode of action of Shiga toxin on peptid elongation of eukaryotic protein synthesis. *Biochem J* 244:287-294

Ogura Y, Mondal SI, Hayashi, Islam MR, Mako T, Arisawa K, Kastura K, Ooka Tadasuke, Gotoh Y, Murase K, Ohnishi M, Hayashi T. 2015. The Shiga toxin 2 production level in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 is correlated with the subtypes of toxin-encoding phage. *Sci Rep* 5:16663

Okuda T, Tokuda N, Numata S, Ito M, Ohta M, Kawamura K, Wiels J, Urano T, Tajima O, Furukawa K. 2006. Targeted disruption of Gb3/CD77 synthase gene resulted in the complete deletion of globo-series glycosphingolipids and loss of sensitivity to verotoxins. *J Biol Chem* 281:10230-10235

Pacheco A, Sperandio V. 2012. Shiga toxin in enterohemorrhagic *E.coli*: regulation and novel anti-virulence strategies. *Front Cell Inf Microbio* 2:81

Persson S, Olsen KEP, Ethelberg S, Scheutz F. 2007. Subtyping method for *Escherichia coli* Shiga toxin (verocytotoxin) 2 variants and correlations to clinical manifestations. *J Clin Microbiol* 45:2020–2024

Paton JC, Paton AW. 1998. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clin Microbiol Rev* 11:450-479

Pérez L, Apezteguia L, Pineyrua C, Dabezies A, Bianco MN, Schelotto F, Varela G. 2014. Hemolytic uremic syndrome with mild renal involvement due to Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) O145 strain. *Rev Argent Microbiol* 46:103-106

Persad AK, LeJeune JT. 2014. Animal reservoirs of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Microbiol Spectrum* 2:EHEC-0027-2014

Pennington H. 2010. *Escherichia coli* O157. *Lancet* 376:1428-1435

Philpott DJ, Ackerley CA, Kiliaan AJ, Karmali MA, Perdue MH, Sherman PM. 1997. Translocation of verotoxin-1 across T84 monolayers: mechanism of bacterial toxin penetration of epithelium. *Am J Physiol* 273:G1349-1358

Pickering LK, Obrig TG, Stapleton FB. 1994. Hemolytic uremic syndrome and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Pediatr Infect Dis J* 13:459-476

Pierard D, Muyldermans G, Moriau L, Stevens D, Lauwers S. 1998. Identification of new verocytotoxin type 2 variant B-subunit genes in human and animal *Escherichia coli* isolates. *J Clin Microbiol* 36:3317-3322

Prager R, Fruth A, Busch U, Tietze E. 2011. Comparative analysis of virulence genes, genetic diversity, and phylogeny of Shiga toxin 2g and heat-stable enterotoxin ST1a encoding *Escherichia coli* isolates from humans, animals, and environmental sources. *Int J Med Microbiol* 301:181-91

Prager R, Fruth A, Siewert U, Strutz U, Tschape H. 2009. *Escherichia coli* encoding Shiga toxin 2f as an emerging human pathogen. *Int J Med Microbiol* 299:343–353

Radostits O, Gay CC, Hinchcliff K, Constable PD. 2007. Diseases associated with *Escherichia coli*. . En: *Veterinary medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats*. Saunders Elsevier, Philadelphia P.A, pp. 847-896

Rangel JM, Sparling PH, Crowe C, Griffin PM, Swerdlow DL. 2005. Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks, United States, 1998-2002. *Emerg Infect Dis* 11:603-609

Ren J, Utsunomiya I, Taguchi K, Ariga T, Tai T, Ihara Y, Miyatake T. 1999. Localization of verotoxin receptors in nervous system. *Brain Res* 825:183-188

Renter DG, Sargeant JM, Oberst RD, Samadpour M. 2003. Diversity, frequency, and persistence of *Escherichia coli* O157 strains from range cattle environments. *Appl Environ Microbiol* 69:542-547

Ritchie JM, Thorpe CM, Rogers AB, Waldor MK. 2003. Critical roles for stx2, eae, and tir in enterohemorrhagic *Escherichia coli*-induced diarrhea and intestinal inflammation in infant rabbits. *Infect Immun* 71:7129-7139

Rivas M, Miliwebsky E, Chinen I, Roldan CD, Balbi L, Garcia B, Fiorilli G, Sosa-Estani S, Kincaid J, Rangel J, Griffin PM, Case-Control Study Group. 2006. Characterization and epidemiologic subtyping of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from hemolytic uremic syndrome and diarrhea cases in Argentina. *Foodborne Pathog Dis* 3:88-96

Rivas M, Chinen I, Miliwebsky E, Masana M. 2014. Risk factors for Shiga toxin-producing *Escherichia coli*-associated human diseases. *Microbiol Spectrum* 2:EHEC-0002-2013

Saeedi P, Yazdanparast M, Behzadi E, Salmanian A. H, Mousavi S. L, Nazarian S, Amani J. 2017. A review on strategies for decreasing *E. coli* O157:H7 risk in animals. *Microb Pathog* 103:186-195

Saldaña Z, Sánchez E, Xicohtencatl-Cortes J, Puente JL, Girón JA. 2011. Surface Structures Involved in Plant Stomata and Leaf Colonization by Shiga-Toxigenic *Escherichia Coli* O157:H7. *Front Microbiol* 2:119

Samuel JE, Perera LP, Wars S, O Brien AD, Ginsburg V, Krivan HC. 1990. Comparison of the glycolipid receptor specificities of Shiga-like toxin type II and Shiga-like toxin type II variants. *Infect Immun* 58:611-618

Sandvig K, Bergan J, Dyve AB, Skotland T, Torgersen ML. 2010. Endocytosis and retrograde transport of Shiga toxin. *Toxicon* 56:1181-1185

Sandvig K. 2001. Shiga Toxins. *Toxicon* 39:1629-1635

Scheutz F, Teel LD, Beutin L, Pierard D, Buvens G, Karch H, Mellmann A, Caprioli A, Tozzoli R, Morabito S, Strockbine NA, Melton- Celsa AR, Sanchez M, Persson S, O Brien AD. 2012. Multicenter evaluation of sequence-based protocol for subtyping shiga toxins and standarizing Stx nomenclature. *J Clin Microbiol* 50:2951-2963

Scheutz F. 2014. Taxonomy meets public health: the case of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Microbiol Spectrum* 2:EHEC-0019-2013

Shimizu T, Ohta Y, Noda M. 2009. Shiga toxin 2 is specifically released from bacterial cells by two different mechanisms. *Infect Immun* 77:2813-2823

Shimizu T, Kawakami T, Sato T, Sasaki M, Higashide T, Hamabata T, Ohta Y, Noda M. 2007. The serine 31 residue of the B subunit of Shiga toxin 2 is essential for secretion in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 75:2189-2200

- Shridhar PB, Siepker C, Noll LW, Shi X, Nagaraja TG, Bai J.** 2017. Shiga Toxin Subtypes of Non-O157 *Escherichia coli* Serogroups Isolated from Cattle Feces. *Front Cell Infect Microbiol* 7:121
- Shringi S, Schmidt CE, Kaya K, Brayton KA, Hancock DD, Besser TE.** 2012. Carriage of stx2a differentiates clinical and bovine-biased strains of *Escherichia coli* O157. *PLoS One* 7:51572
- Snedeker KG, Shaw DJ, Locking ME, Prescott RJ.** 2009. Primary and secondary cases in *Escherichia coli* O157 outbreaks: a statistical analysis. *BMC Infect Dis* 9:144
- Spooner RA, Lord JM.** 2012. How ricin and Shiga toxin reach the cytosol of target cells: retrotranslocation from the endoplasmic reticulum. *Curr Top Microbiol Immunol* 357:19-40
- Stamm I, Mohr M, Bridger PS, Schropfer E, Konig M, Stoffregen WC, Dean-Nystrom EA, Baljer G, Menge C.** 2008. Epithelial and mesenchymal cells in the bovine colonic mucosa differ in their responsiveness to *Escherichia coli* Shiga toxin 1. *Infect Immun* 76:5381-91
- Stephan R, Hoelzle LE.** 2000. Characterization of Shiga toxin type 2 variant B-subunit in *Escherichia coli* strains from asymptomatic human carriers by PCR-RFLP. *Lett Appl Microbiol* 31:139-142
- Steyert SR, Sahl JW, Fraser CM, Teel LD, Scheutz F, Rasko DA.** 2012. Comparative genomics and stx phage characterization of LEE-negative Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Front Cell Infect Microbiol* 2:133
- Strockbine, NA, Jackson MP, Sung LM, Holmes RK, O'Brien AD.** 1988. Cloning and sequencing of the genes for Shiga toxin from *Shigella dysenteriae* type 1. *J Bacteriol* 170:1116-1122
- Tam PJ, Lingwood CA.** 2007. Membrane cytosolic translocation of verotoxin A1 subunit in target cells. *Microbiology* 153:2700-2710
- Tam PJ, Mahfoud R, Nutikka A, Khine A, Binnington B, Paroutis P, Lingwood C.** 2008. Differential intracellular transport and binding of verotoxin 1 and verotoxin 2 to globotriaosylceramide-containing lipid assemblies. *J Cell Physiol* 216:750-763
- Tarabuso AL.** 2011. Fabry disease. *Skinmed* 9:123-177
- Tarr PI, Neill MA, Clausen CR, Watkins SL, Christie DL, Hickman RO.** 1990. *Escherichia coli* O157:H7 and the hemolytic uremic syndrome: importance of early cultures in establishing the etiology. *J Infect Dis* 162:553-556
- Terajima J, Iyoda S, Ohnishi M, Watanabe H.** 2014. Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* in Japan. *Microbiol Spectrum* 2:EHEC-0011-2013
- Tesh VL, Ramegowda B, Samuel JE.** 1994. Purified Shiga-like toxins induce expression of proinflammatory cytokines from murine peritoneal macrophages. *Infect Immun* 62:5085-5094
- Thorpe CM, Smith WE, Hurley BP, Acheson DW.** 2001. Shiga toxins induce, superinduce, and stabilize a variety of C-X-C chemokine mRNAs in intestinal epithelial cells, resulting in increased chemokine expression. *Infect Immun* 69:6140-6147

Umpiérrez A, Bado I, Oliver M, Acquistapace S, Etcheverría A, Padola NL, Vignoli R, Zunino P. 2017a. Zoonotic Potential and Antibiotic Resistance of *Escherichia coli* in Neonatal Calves in Uruguay. *Micobes Environ* 32:275-282.

Umpiérrez A, Fernández M, Ernst D, Szpinak V, Casaux L, Caffarena D, Schild C, Monesiglio C, Giannitti F, Fraga M, Zunino P. 2017b. Estudio de *Escherichia coli* asociada a diarrea neonatal y mortalidad de terneros neonatos en Uruguay. Poster presentado en I Jornadas Científicas “Prof. Clemente Estable” 26 al 27 de Septiembre de 2017. Sala Acuña de Figueroa Anexo al Palacio Legislativo

Utsunomiya I, Ren J, Taguchi K, Ariga T, Tai T, Ihara Y, Miyatake T. 2001. Immunohistochemical detection of verotoxin receptors in nervous system. *Brain Res Protoc* 8:99-103

van Setten PA, van Hinsbergh VW, van den Heuvel LP, Preyers F, Dijkman HB, Assmann KJ, van der Velden TJ, Monnens LA. 1998. Monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 levels in urine and serum of patients with hemolytic uremic syndrome. *Pediatr Res* 43:759–767

Werber D, Mason BW, Evans MR, Salmon RL. 2008. Preventing household transmission of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 infection: promptly separating siblings might be the key. *Clin Infect Dis* 46:1189–1196

Widiasih DA, Ido N, Omoe K, Sugii S, Shinagawa K. 2004. Duration and magnitude of faecal shedding of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from naturally infected cattle. *Epidemiol Infect* 132:67-75

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. *J Clin Microbiol* 36:1604-1607

Yamasaki C, Natori Y, Zeng XT, Ohmura M, Yamasaki S, Takeda Y, Natori Y. 1999. Induction of cytokines in a human colon epithelial cell line by Shiga toxin 1 (Stx1) and Stx2 but not by non-toxic mutant Stx1 which lacks N-glycosidase activity. *FEBS Lett* 442:231–234

Zhang X, McDaniel AD, Wolf LE, Keusch GT, Waldor MK, Acheson DW. 2000. Quinolone antibiotics induce Shiga toxin-encoding bacteriophages, toxin production, and death in mice. *J Infect Dis* 181:664–670