



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

Evaluación de la presencia de genes de virulencia
y relaciones filogenéticas de *Escherichia coli*
asociada a DNT en Uruguay

Bach. Martín Oliver

Tutor: Pablo Zunino

Co-tutor: Ana Umpiérrez

Departamento de Microbiología

Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable

2016

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	4
INTRODUCCIÓN	5
Diarrea neonatal en terneros (DNT).....	6
Clasificación de la diarrea	7
Factores de riesgo	7
Signos y Síntomas:	8
Etiología.....	9
<i>Escherichia coli</i> y su papel en la DNT.....	10
Patotipos.....	11
<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica (ETEC):.....	11
<i>Escherichia coli</i> shigatoxigénica (STEC):	13
<i>Escherichia coli</i> enteropatógena (EPEC):.....	16
<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica (EHEC):	19
Tratamiento y prevención de la DNT	20
Diagnóstico	21
HIPÓTESIS	24
OBJETIVO GENERAL	24
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	25
Aislamientos bacterianos	25
Condiciones de cultivo y extracción de ADN.....	26
PCR convencional y visualización de los productos por electroforesis en gel de agarosa.....	27
Genes de virulencia	27

<i>Multilocus Sequence Typing</i> (MLST)	28
Confirmación de la identidad de los productos de PCR y análisis de secuencias	29
Genes de virulencia	29
<i>Multilocus Sequence Typing</i>	30
Relaciones filogenéticas	30
<i>Multilocus Sequence Typing</i>	30
RESULTADOS	31
Determinación de la presencia del gen <i>eae</i> mediante PCR convencional	31
Determinación de la presencia del gen <i>stx1</i> mediante PCR convencional	32
Determinación de la presencia del gen <i>stx2</i> mediante PCR convencional	32
Análisis de secuencias.....	33
Puesta a punto de la técnica de PCR convencional para 7 genes <i>housekeeping</i> de <i>E. coli</i>	35
Secuenciación y edición de las secuencias obtenidas a partir de las amplificaciones parciales de cada gen	35
Asignación de ST o generación de nuevos ST de <i>E. coli</i>	36
Evaluación de las relaciones filogenéticas y diversidad de la colección.	39
DISCUSIÓN	41
CONCLUSIONES.....	44
REFERENCIAS.....	45

ABREVIATURAS

AEEC: *Escherichia coli* de adhesión y borrado

AL: Aglutinación en látex

ATEC: *Escherichia coli* enteropatógena atípica

DAEC: *Escherichia coli* de adherencia difusa

DGGE: *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*

DNT: Diarrea Neonatal de Terneros

EAEC: *Escherichia coli* enteroagregativa

EHEC: *Escherichia coli* enterohemorrágica

EIEC: *Escherichia coli* enteroinvasiva

ELISA: *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*

EPEC: *Escherichia coli* enteropatógena

ETEC: *Escherichia coli* enterotoxigénica

ExPEC: *Escherichia coli* extraintestinal

HP: Histopatología

LEE: *Locus of enterocyte effacement*

ME: Microscopía electrónica

MLST: *Multilocus Sequence Typing*

PCR: *Polymerase Chain Reaction*

PFGE: *Pulsed Field Gel Electrophoresis*

rep-PCR: *repetitive element sequence PCR*

ST: Secuenciotipo

STEC: *Escherichia coli* productora de Toxina Shiga

Stx: Toxina Shiga

SST3: Sistema de secreción de tipo 3

TSA: Triptosa Soya Agar

INTRODUCCIÓN

Desde sus orígenes la ganadería uruguaya se ha distinguido por llevarse adelante bajo sistemas extensivos de producción. Estos sistemas se caracterizan por emplear grandes superficies y una baja dotación animal. No obstante, en los últimos años el sector ganadero se ha visto presionado a realizar un uso más eficiente de sus recursos para lograr una mayor rentabilidad. Este contexto no solo es generado por una demanda creciente de alimentos a nivel mundial sino también por el advenimiento de actividades como la agricultura o la forestación (Fig. 1) cuya rentabilidad en muchos casos supera y, por amplio margen, a la de la ganadería (“Anuario estadístico Agropecuario 2013” – DIEA, Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca.).

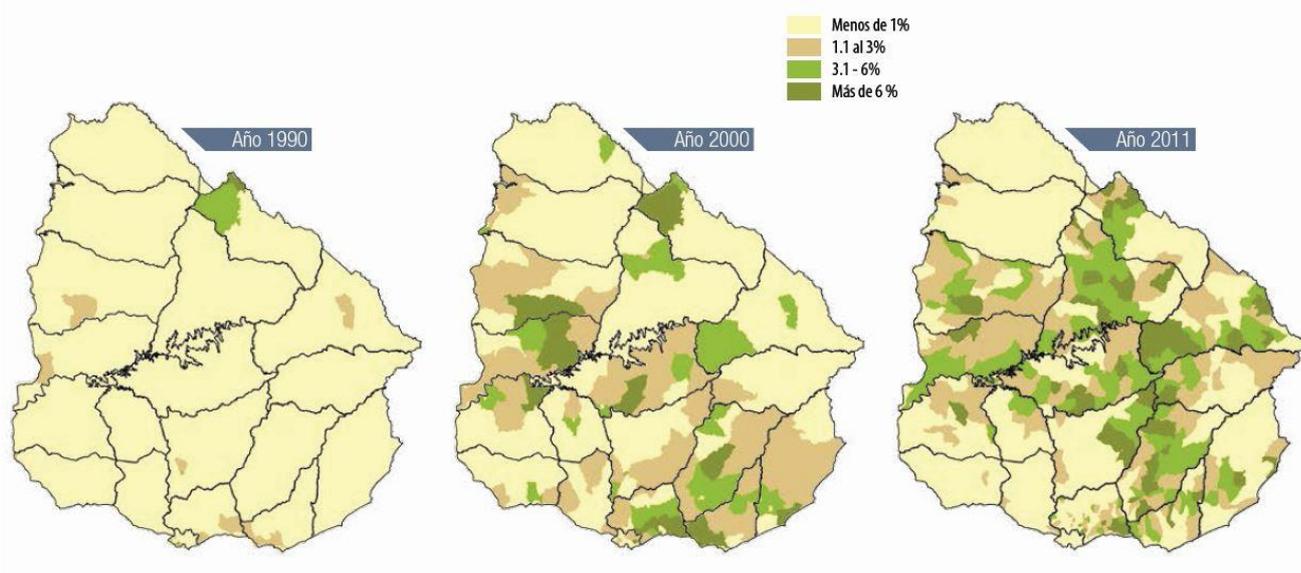


Figura 1: Porcentaje de explotaciones con forestación como principal fuente de ingreso, por área de enumeración. Censos 1990, 2000 y 2011. Tomado de “Anuario estadístico Agropecuario 2013” – DIEA, Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca.

Como consecuencia de lo antedicho, Uruguay ha tendido a modificar su matriz productiva adoptando sistemas semi-intensivos e intensivos. Estos sistemas buscan incrementar la producción por unidad de superficie basándose en el confinamiento total o parcial de los animales. No obstante, si bien las rentabilidades crecen, los mayores niveles de estrés y la elevada concentración animal en estos

sistemas traen consigo una mayor incidencia de enfermedades infectocontagiosas, las que pueden poner en riesgo su sustentabilidad (Lorenz *et al.* 2011).

Entre las enfermedades que afectan al ganado bovino se encuentran la diarrea (de etiología diversa), la queratoconjuntivitis infecciosa bovina, clostridiosis y enfermedad respiratoria, esta última también causada por múltiples agentes (Lorenz *et al.* 2011; Kolenda *et al.* 2015; Angelos 2015; Murray *et al.* 2016).

Diarrea neonatal en terneros (DNT)

La diarrea neonatal (DNT) es considerada la enfermedad que más frecuentemente afecta terneros jóvenes a nivel mundial, tanto en rodeos lecheros como de carne (Dirksen *et al.* 2005; Lorenz *et al.* 2011). Es una enfermedad que aqueja a terneros entre las 12 horas post parto y los 35 días de vida. Los hallazgos clínicos se caracterizan por la presencia de heces acuosas y profusas, deshidratación progresiva, acidosis y en casos severos muerte en pocos días (Odeón, 2001). La importancia de la enfermedad resulta evidente al observar los índices de morbilidad y mortalidad de animales asociados a la misma. Según datos obtenidos de estadísticas a nivel mundial, en sistemas de explotación lecheros el índice de morbilidad de esta enfermedad es normalmente un 30%, pudiendo alcanzar el 75% en algunos casos; mientras que el índice de mortalidad varía entre el 10 y el 50%, dependiendo del tratamiento clínico asignado (Radostits *et al.* 2007; Lorenz *et al.* 2011; Cho y Yoon 2014). Por otra parte en sistemas ganaderos de carne los índices de morbilidad varían entre el 10 y el 50%, y los de mortalidad entre el 5 y el 25% o incluso superior en algunos años (Radostits *et al.* 2007; Lorenz *et al.* 2011; Cho y Yoon 2014). Vale también hacer mención de datos a nivel regional de los que se tiene información, en Argentina por ejemplo, se estima que la incidencia de la enfermedad puede llegar a ser superior al 60% y la mortalidad hasta de un 20% (Margueritte *et al.* 2005).

Si estos índices se ponderan económicamente, las pérdidas suelen ser muy elevadas lo que claramente le quita competitividad al sistema (Bilbao *et al.* 2012).

Clasificación de la diarrea

La diarrea se puede clasificar en 3 categorías: leve, moderada y grave. En la diarrea leve los terneros no pierden condición corporal y la misma suele revertir en un plazo de 2 a 3 días, por lo que no requiere atención clínica. Por otro lado, en la diarrea moderada, los terneros requieren atención clínica y responden favorablemente al tratamiento; solamente se observan muertes en casos aislados. Finalmente, en casos de diarrea grave se requiere atención clínica inmediata con restitución de líquidos y tratamientos sintomáticos. Estos cuadros son difíciles de revertir y comúnmente se observa muerte de los animales (Margueritte *et al.* 2005). La terapia electrolítica es considerada una herramienta fundamental, siendo la elección de una solución rehidratante correcta de suma importancia para la recuperación del animal (Lorenz *et al.* 2011).

Factores de riesgo

En la DNT se distinguen 7 principales factores de riesgo: hacinamiento, número de partos de la hembra, factores meteorológicos, calidad de la dieta, cuidado y manejo de los terneros, estado inmunitario obtenido por el calostro y factores asociados al ternero mismo (Radostits *et al.* 2007).

El hacinamiento, es decir un elevado número de animales en una superficie reducida es característico de sistemas intensivos de producción y está asociado a un incremento en los índices de infección (Radostits *et al.* 2007). En cuanto al número de partos de la hembra, se sabe que terneros nacidos de vacas primíparas tienen una probabilidad cuatro veces superior de desarrollar diarrea que aquellos terneros nacidos de vacas múltiparas, y esto está asociado al comportamiento maternal de la hembra que puede no proveer los niveles de inmunoglobulinas adecuados en volumen y calidad (Radostits *et al.* 2007). Asimismo, con los factores de riesgo meteorológicos se ha observado una relación directa entre condiciones climáticas adversas y el incremento en la incidencia de DNT (Radostits *et al.* 2007). En lo que respecta a calidad de la dieta, los sustitutos lácteos empleados en tambos para alimentación de los terneros (leche desnatada desnaturalizada por calor o fuente de proteína vegetal y elevado contenido en fibra), en su mayoría son menos

digeribles que la leche materna, lo que conduce a una acumulación de alimento parcialmente digerido en el intestino facilitando un sustrato ideal para el crecimiento de microorganismos (Blanchard 2012). Por otra parte el cuidador de los terneros suele jugar un rol fundamental en proveer las condiciones de cría adecuadas mediante la implementación de buenas prácticas higiénico-sanitarias para evitar la difusión de la enfermedad (Odeón 2001). La inmunidad obtenida por el calostro es quizás uno de los principales aspectos que guarda extrema relación con el desarrollo de la enfermedad. Niveles bajos de inmunoglobulinas séricas provocan que los terneros sean más susceptibles a morir por diarrea (Radostits *et al.* 2007). En cuanto a los factores de riesgo del animal, estos incluyen la inmadurez del neonato al nacer, falta de vigor, y el desarrollo de acidosis como consecuencia de la hipoxia sufrida en partos distócicos (Radostits *et al.* 2007).

Signos y Síntomas:

Los signos clínicos dependerán mucho de varios factores como el o los patógenos implicados, sus atributos virulentos, la edad y el estado inmunitario del ternero, entre otros (Dirksen *et al.* 2005).

Las heces diarreicas normalmente son amarillas claras hasta lechosas grises con flóculos de moco, mientras que en la diarrea fuerte pueden llegar a tomar una coloración verdosa (Dirksen *et al.* 2005). La presencia de sangre en las heces no pertenece al cuadro clínico clásico de DNT, no obstante algunos de los patógenos implicados puede producir su aparición. El pH de las heces de terneros diarreicos oscila entre 5,6 y 6,3, ligeramente superior al de terneros lactantes sanos (5,3 – 6,1) (Dirksen *et al.* 2005).

El transcurso de la enfermedad suele comenzar con fiebre leve, en el entorno de los 40°C. La sintomatología más importante es consecuencia de la pérdida de líquidos y electrolitos que causa deshidratación isotónica o levemente hipotónica; disminuyendo la turgencia cutánea, y observándose enoftalmia (en deshidrataciones mayores al 8 %). Si la enfermedad persiste y no se da la correcta atención clínica, hay caída en decúbito lateral con hipotermia, miembros fríos, y mucosas pálidas a cianóticas a causa del shock hipovolémico (Dirksen *et al.* 2005). Como consecuencia de lo anterior se produce una acidosis metabólica, que trae aparejado

un aumento de la frecuencia respiratoria como mecanismo compensatorio. La causa principal de la alteración acido-base es la pérdida de bicarbonato a nivel intestinal con la diarrea (denominada acidosis por sustracción). En casos de deshidrataciones graves sobreviene una acidosis por adición a causa de una menor excreción de ácidos a nivel renal y una mayor producción de estos (Dirksen *et al.* 2005).

Etiología

Las causas de la diarrea pueden ser infecciosas o no infecciosas. La primera de ellas genera mayores complicaciones ya que compromete la viabilidad del sistema (Odeón, 2001). Varios agentes enteropatógenos se asocian con DNT y su prevalencia relativa cambia de acuerdo a la localización geográfica, la estación del año, el establecimiento ganadero y la edad de los terneros (Kahn 2007; Radostits *et al.* 2007). Entre los microorganismos enteropatógenos más comunes se encuentran: Rotavirus, Coronavirus, *Escherichia coli*, especies de *Salmonella*, *Cryptosporidium parvum* y *Clostridium perfringens* de los tipos B y C (Tabla 1) (Radostits *et al.* 2007).

Tabla 1: Principales patógenos entéricos de terneros menores de 35 días y rango etario en el que se presentan. Resultado obtenido de 2311 necropsias realizadas. Adaptado de Blanchard 2012.

Patógeno	Muestras Positivas (%)	Rango Etario (días)
<i>Cryptosporidium</i> spp.	37.2	3 - 33
Coronavirus	30.5	1 - 30
Rotavirus	26.6	1 - 32
<i>Salmonella</i> spp.	15.7	----
AEEC	10.5	1 - 31
ETEC	4.5	1 - 7

Los virus son los agentes etiológicos más importantes, siendo un factor predisponente para infecciones bacterianas secundarias (Margueritte *et al.* 2005). Causan destrucción y atrofia de las células del epitelio intestinal, impidiendo la correcta absorción de nutrientes y generando una acumulación de alimento

parcialmente digerido en la luz intestinal. Además, dicho alimento, induce un aumento de la presión osmótica, lo que favorece el proceso diarreico (Margueritte *et al.* 2005). En países de la región como Argentina y Brasil el rotavirus bovino se encuentra ampliamente distribuido y la asociación con *C. parvum* y *E. coli* es motivo de importantes pérdidas en los primeros días de vida de los terneros (Bellizoni *et al.* 1990; Margueritte *et al.* 2007; Salvador *et al.* 2003). Se estima que a nivel mundial la asociación de rotavirus, especies de *Cryptosporidium*, Coronavirus y *E. coli*, son responsables del 75 % al 95 % de las infecciones en terneros neonatos (Radostits *et al.* 2007).

Escherichia coli y su papel en la DNT

E. coli es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo, presente en el tracto digestivo de muchas especies animales. Dicho microorganismo coloniza el intestino estéril de animales recién nacidos, con los cuales establece una relación de comensalismo, pasando a formar parte de la microbiota del animal y alcanzando concentraciones de 10^7 a 10^9 microorganismos por gramo de materia fecal (Gyles y Fairbrother 2010). Estos microorganismos son incorporados por el recién nacido, provenientes de la microbiota materna y ambiental y su concentración a nivel del tracto digestivo se incrementa en las porciones distales del intestino, haciéndose máximas en el intestino grueso (Gyles y Fairbrother 2010). No suelen causar infección, excepto en hospederos inmunocomprometidos o cuando se altera la barrera gastrointestinal (Kaper *et al.* 2004). De todas maneras existen serotipos de *E. coli* que han desarrollado la capacidad de infectar hospederos sanos mediante la adquisición de factores de virulencia, debido a la enorme plasticidad de su material genético (Croxen y Finaly 2010; Tenaillon *et al.* 2010). A modo de ejemplo, los aislamientos de *E. coli* secuenciados hasta el momento muestran un *core* genoma de aproximadamente 2200 genes y un *pan* genoma de 13000 genes (Rasko *et al.* 2008). La adquisición de islas de patogenicidad y otros elementos genéticos móviles, hacen que los genomas de aquellas *E. coli* patógenas puedan ser hasta 1 Megabase (Mb) más grandes en comparación con cepas comensales, lo que deja en claro la contribución que esto significa a la emergencia de nuevos patotipos (Croxen y Finaly 2010).

El reconocimiento de *E. coli* como causante de diarrea y septicemia en terneros data de aproximadamente 120 años (Moxley y Smith 2010). Si bien su clasificación ha sido bastante controversial, una de las más aceptadas en la comunidad científica ha sido la organización de acuerdo a sus características genéticas, en patotipos. Actualmente se distinguen 10 patotipos de *E. coli*, 8 de ellos asociados a enfermedades entérico/diarreicas, constituyendo las llamadas *E. coli* diarreogénicas (DEC) y 2 responsables de infecciones extraintestinales (ExPEC) (Kaper *et al.* 2004; Nguyen *et al.* 2010). Dentro de los patotipos que son capaces de causar enfermedades entérico/diarreicas, se encuentran: *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* shigatoxigénica (STEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* de adherencia difusa (DAEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) y *E. coli* enteropatógena atípica (ATEC) (Kaper *et al.* 2004; Muller *et al.* 2007; Schmidt 2010). Dentro de los patotipos más relevantes, en lo que a infecciones en bovinos se refiere y en particular a DNT, se encuentran ETEC, EPEC, EHEC y STEC (Kaper *et al.* 2004).

Patotipos

***Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC):** Este patotipo se caracteriza por la presencia de adhesinas fimbriales, adhesinas no fimbriales, enterotoxinas y α -hemolisina (Mainil 2013). Causa diarrea en terneros principalmente durante la primera semana de vida (Foster y Smith 2009). Según indican estudios epidemiológicos en terneros de carne y leche, más del 80 % de los casos clínicos de infecciones por ETEC se dan en terneros menores de 4 días (Radostits *et al.* 2007). Si bien no se conocen con certeza estos mecanismos de resistencia asociados a la edad, se cree que puede deberse a 2 motivos: la sustitución de las células epiteliales intestinales que ocurre en los primeros días después del nacimiento, o a la desaparición de los receptores de la superficie celular. Por ejemplo, algunos trabajos destacan que los receptores para la adhesina F5, que están presentes en el segmento distal del intestino delgado de terneros jóvenes, desaparecen luego de pocos días de vida (Gyles y Fairbrother 2010).

ETEC se une a las células de intestino delgado mediante factores de colonización (CFs) (Croxen y Finlay 2010). Hasta el momento se conocen al menos

22 variantes proteicas de CFs, los que pueden ser subdivididos en 3 grupos: CFA (antígeno de colonización), CS (antígeno de superficie coli) y PCF (factor de colonización putativo) (Kaper *et al.* 2004). Estudios recientes han demostrado que la proteína EtpA del extremo flagelar puede también ser empleada como un factor de adherencia a las células epiteliales (Fig. 2). Estos elementos proteicos antes mencionados proveen la adhesión inicial mientras que proteínas de membrana externa como Tia y TibA proporcionan una unión más íntima de este patotipo (Fig. 2) (Croxen y Finlay 2010).

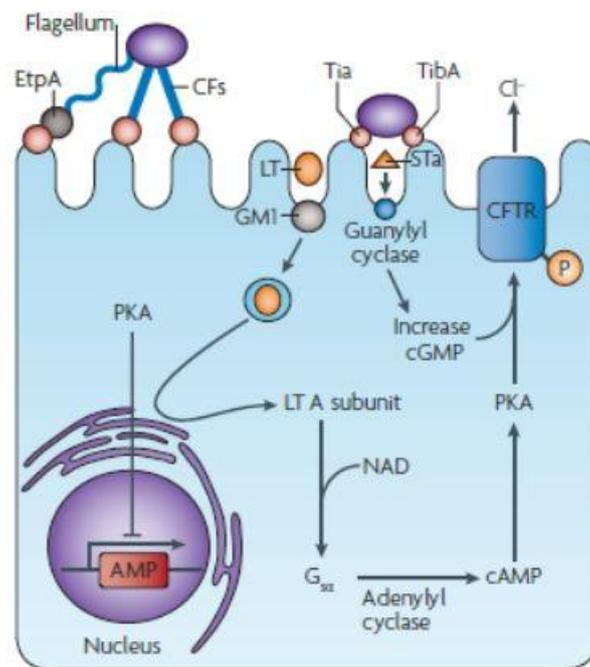


Figura 2: Mecanismo patogénico de ETEC. Tomado de Croxen y Finlay (2010).

Entre los factores de colonización fimbriales se encuentran F5 (K99), F4 (K88), F41 y F17 entre otras, siendo los dos primeros exclusivos de ETEC causante de diarrea en animales (Ok *et al.* 2009; Nguyen *et al.* 2010). Además de los factores de colonización, este patotipo tiene la capacidad de liberar enterotoxinas al medio donde se multiplica, causando un aumento marcado en la secreción intestinal de electrolitos (Kaper *et al.* 2004). Se distinguen así, 2 tipos de enterotoxinas: las termolábiles (LTs) y las termoestables (STs). Estas enterotoxinas se encuentran

ambas codificadas en plásmidos y son producidas por cepas de ETEC ya sea en forma individual o en combinación (Kaper *et al.* 2004).

***Escherichia coli* shigatoxigénica (STEC):** Este patotipo fue descrito por primera vez en 1977 (Konowalchuk *et al.* 1977) y está asociado a una gran variedad de enfermedades en humanos entre las que se encuentran diarrea, colitis hemorrágica (CH) y síndrome urémico hemolítico (por su sigla en inglés, HUS) (Karmali 1989). La característica distintiva de este patotipo es la capacidad de producir toxina Shiga (Stx) como principal factor de virulencia (Konowalchuk *et al.* 1977). Se distinguen 2 variantes, Stx1 y Stx2 codificadas por los genes *stx1* y *stx2* respectivamente.

Los bovinos están identificados como uno de los principales reservorios de este patotipo, no obstante su rol patogénico en estos es bastante discutido (Neill 1997; Kaper *et al.* 2004). En bovinos la porción recto-anal en la parte distal del intestino grueso ha sido identificada como el principal sitio de colonización por STEC (Naylor *et al.* 2003). Como ocurre con los humanos, los bovinos adquieren STEC a través del consumo de comida y agua contaminada o a través del contacto con materia fecal de animales portadores (Besser *et al.* 2001). La colonización de STEC en bovinos es comúnmente asintomática debido a la ausencia de Gb3 (globotriaosylceramida), el receptor vascular para la toxina Shiga, principalmente a nivel de la vasculatura intestinal lo que impide que la toxina se distribuya a nivel sistémico alcanzando órganos sensibles a la misma (Pruimboon-Brees *et al.* 2000; Nguyen y Sperandio. 2012).

STEC es distribuida por los animales colonizados principalmente a través de las heces, aunque los genes de la toxina Shiga han sido detectados en la leche de vacas con mastitis (Lira *et al.* 2004). Si bien esto no es lo más frecuente, puede significar el comienzo de una infección por STEC en terneros en amamantamiento o en su defecto en personas que consuman leche no pasteurizada proveniente de estos animales (Lira *et al.* 2004).

Según indican estudios independientes, la prevalencia global de STEC O157 varía entre 0,2 y 48,8 % en animales de leche y 0,2 a 27,8 % en animales de carne; de la misma forma la prevalencia global de STEC no-O157 se encuentra en el rango de 0,4 a 74 % en animales de leche mientras que en animales de carne la misma oscila entre 2,1 a 70,1 % (Hussein y Bollinger 2005; Hussein y Sakuma 2005). Se sabe también que la excreción de STEC tiene 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 lo que a terneros se refiere, se ha observado que durante la lactación los niveles de excreción de STEC en las heces son mínimos, mientras que los máximos se observan inmediatamente luego del destete (Nielsen *et al.* 2002).

Toxinas Shiga:

Las toxinas Shiga, también llamadas verotoxinas, son un grupo de toxinas de naturaleza proteica de tipo AB₅ (Fig. 3) de aproximadamente 70 KDa (Melton-Celsa 2014.) Esta familia de toxinas se encuentra dividida en 2 grupos: toxina Shiga tipo 1 y toxina Shiga tipo 2. Dentro de cada grupo se distinguen variantes o subtipos en base a diferencias en su actividad biológica y secuencia aminoacídica. Hasta el momento se conocen 107 variantes: 14 de Stx1 y 93 de Stx2 (Scheutz *et al.* 2012). La identificación de estas variantes es clínicamente relevante ya que se han observado solidas asociaciones entre estas y ciertas enfermedades (Kawano *et al.* 2008).



Figura 3: Estructura cristalográfica de Stx1. Tomada de Melton-Celsa 2014

Estas toxinas se encuentran codificadas por profagos, por lo que en aquellos hospederos infectados por múltiples profagos, se puede dar la producción de más

de una variante de la toxina. Esto también tiene implicancias del punto de vista del surgimiento de nuevas variantes, aumentando la probabilidad de recombinación entre secuencias de fagos (Johansen *et al.* 2001).

Su producción en *E. coli* es dependiente de la inducción del fago, viéndose estimulada también en condiciones de baja concentración de hierro y presencia de antibióticos, catecolaminas, etanolamina y peróxido de hidrógeno (Kendall *et al.* 2012; O'Brien *et al.* 1982; Zhang *et al.* 2000). Una vez que la toxina se acumula en el espacio periplásmico (Donohue-Rolfe y Keusch 1983) puede ser liberada de 3 formas diferentes: mediante la lisis bacteriana inducida por el fago y su ciclo lítico (Neely y Friedman 1998), mediante lisis mediada por el sistema inmune del hospedero o como se ha descrito recientemente, mediante un sistema de secreción a partir de la célula viable de *E. coli* (Shimizu *et al.* 2009).

Las toxinas Shiga se unen a la superficie celular a través de Gb3, un glicoesfingolípido cuya función no se ha descrito (Lindberg *et al.* 1987). La unión Stx-Gb3 lleva a la internalización del complejo toxina-receptor mayormente a través de mecanismos dependientes de clatrina (Bergan *et al.* 2012). Una vez internalizada la toxina Shiga emplea el transporte retrogrado desde el endosoma temprano hacia el trans Golgi y de éste al retículo endoplásmico (Sandvig *et al.* 1989). La subunidad B de esta toxina es la encargada de dirigir este transporte al retículo (Sandvig *et al.* 1994), de todas formas el mecanismo por el cual se transloca al citosol no está del todo claro. Una vez en el citosol el fragmento A1 de la toxina, escapa a la degradación por el proteasoma (Hazes y Read 1997), y se une a la subunidad de ARN ribosomal 28S de la célula eucariota sobre la que cliva un residuo de adenina bloqueando la síntesis proteica (Endo *et al.* 1988). Esta inhibición de la síntesis proteica lleva a una acumulación de proteínas parcialmente plegadas o defectuosas en el retículo endoplásmico, contribuyendo al estrés del organelo y a la liberación de Ca^{2+} al citosol con la consecuente activación de la cascada de caspasas que conducen el proceso de apoptosis (Lee *et al.* 2008).

Llamativamente, además del mencionado efecto sobre células eucariotas, las toxinas de tipo Shiga son capaces de alterar la síntesis proteica de forma similar en células procariotas (Suh *et al.* 1998). Esto ha llevado a considerar la posibilidad de que Stx facilite la sobrevivencia bacteriana mediante la inhibición del crecimiento de sus competidores cercanos, en ambientes como el lumen del tracto gastrointestinal (Morabito 2014).

***Escherichia coli* enteropatógena (EPEC):** Este patotipo se caracteriza por producir exclusivamente el tipo de lesión histológica que se observa en la Fig. 4. Esta lesión consiste en el borrado de las microvellosidades de los enterocitos acompañado de la formación de un pedestal y una adhesión íntima (menor a 10 nm de separación) entre la célula bacteriana y la membrana de las células del epitelio intestinal. La lesión con estas características se denomina de “adhesión y borrado” (A/E – del inglés *attaching and effacing*) y los patotipos de *E. coli* que son capaces de producirla, entre ellos EPEC, se agrupan como “*attaching/effacing*” *E. coli* (AEEC) (Moon *et al.* 1983; Moxley y Smith 2010; Mainil 2013).

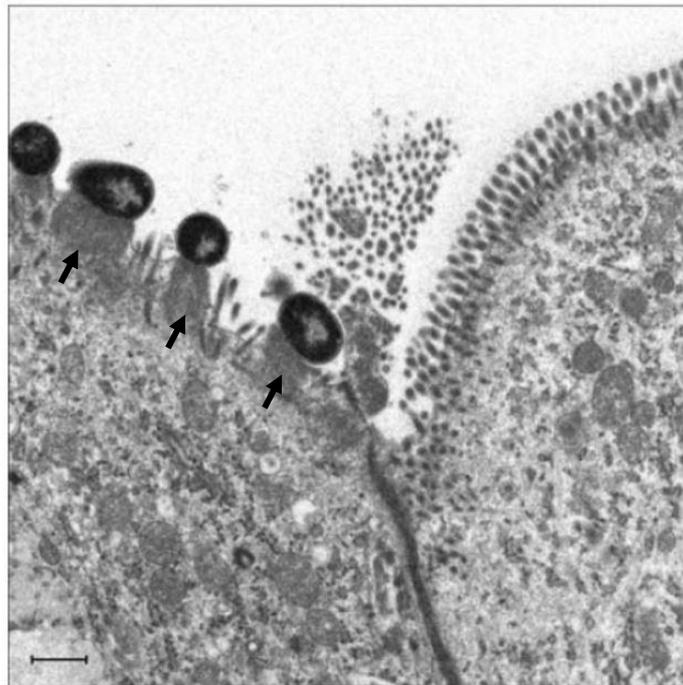


Figura 4: Microscopía electrónica de transmisión en donde se observa el tipo de lesión A/E producido por una cepa AEEC en los enterocitos del colon espiral de un ternero neonato. A la izquierda, célula infectada: microvellosidades borradas y formación del pedestal debajo de la célula bacteriana (flechas). Foto tomada de Pallen *et al.* 2005.

La generación de este tipo de lesiones requiere de 3 pasos fundamentales: 1) la adhesión inicial entre la bacteria y el enterocito, 2) el colapso de las microvellosidades en la zona de adhesión y 3) la formación del pedestal. (Guttman

et al. 2006). Para que ocurra la adhesión inicial, la bacteria debe superar por lo menos 2 barreras. La primera de ellas la constituye el mucus intestinal (Drumm *et al.* 1988; Smith *et al.* 1995; Mack *et al.* 1999; Larson *et al.* 2003; Lindén *et al.* 2008). La segunda barrera que deben superar las bacterias son las microvellosidades, los primeros componentes celulares en tomar contacto con aquellas. Este primer contacto es llevado adelante por estructuras fibrilares bacterianas capaces de retraerse y aproximar la bacteria al enterocito, particularmente el pili tipo IV denominado BFP (*bundle-forming pilus*) (Cleary *et al.* 2004; Humphries *et al.* 2010, Khursigara *et al.* 2001).

Isla de patogenicidad LEE:

Las cepas de EPEC y EHEC -comentada más adelante- tienen en común la capacidad de formar lesiones del tipo A/E (Croxen y Finlay, 2010). Los elementos necesarios para tales efectos se encuentran codificados fundamentalmente en la isla de patogenicidad LEE (Fig. 5) (McDaniel *et al.* 1995; Elliott *et al.* 1998). Ésta también alberga los genes ampliamente conservados para el sistema de secreción de tipo III (SST3), y los genes comparativamente más variables de otras proteínas efectoras que serán inyectadas directamente en el citoplasma de la célula blanco (Muller *et al.* 2008; Muller *et al.* 2009; Enninga y Rosenshine 2009).

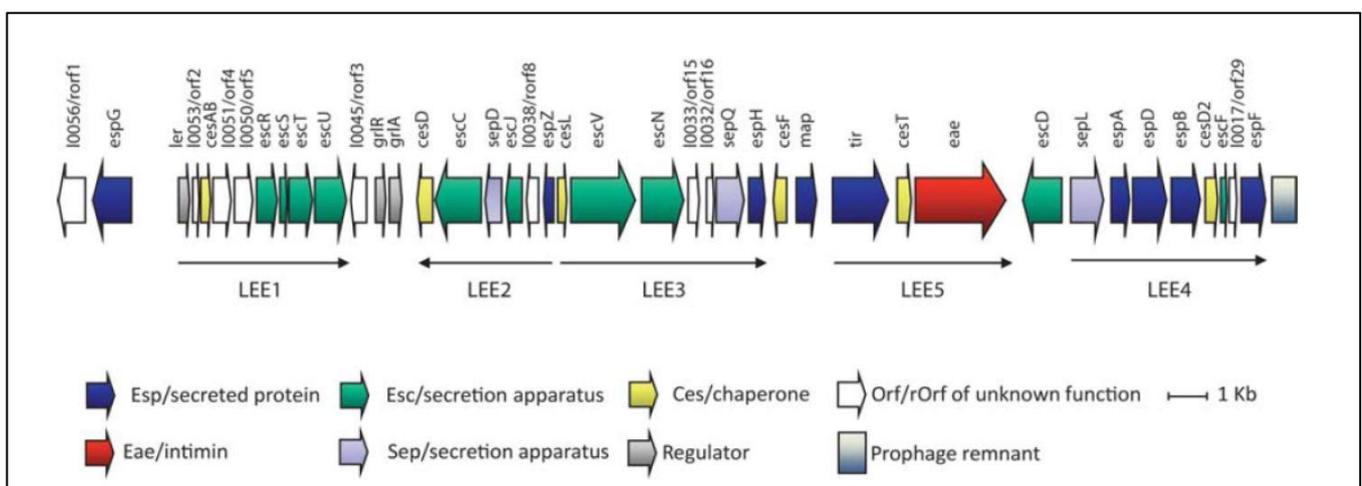


Figura 5: Organización genética ilustrativa de la isla de patogenicidad LEE de *E. coli* O157:H7. Tomado de Stevens y Frankel 2014.

La isla de patogenicidad LEE codifica dos factores de virulencia de suma relevancia que merecen una mención especial, la proteína de membrana externa denominada intimina y el receptor translocado de intimina, Tir. La intimina es una proteína de aproximadamente 94 kDa codificada por el gen *eae* encontrada en todas aquellas cepas capaces de inducir la lesión de tipo A/E (Nataro y Kaper 1998). Su extremo N-terminal se encuentra altamente conservado entre los patógenos que producen este tipo de lesión, a diferencia del extremo C-terminal que presenta una menor homología de secuencia (Frankel *et al.* 1994). Estas diferencias han sido empleadas como base para la clasificación en los diferentes subtipos, habiéndose identificado hasta el momento un total de 27 variantes (18 tipos diferentes y 9 subtipos). Entre ellos, los subtipos con mayor relevancia clínica son el α , el β y el γ (Adu-Bobie *et al.* 1998). La intimina es la única proteína de membrana conocida indispensable para que se produzca la adhesión y colonización intestinal en animales por patógenos A/E. Su gran afinidad por su receptor Tir es responsable de la estrecha adhesión célula epitelial-bacteria. (Kenny *et al.* 1997; DeVinney *et al.* 1999b). Dicho receptor una vez translocado a través de SST3 a la célula del hospedero, se integra a la membrana plasmática exponiendo sus 2 extremos terminales hacia el citoplasma y un dominio extracelular encargado de la unión con la Intimina (Campellone *et al.* 2003). Esta interacción es fundamental para iniciar el proceso de recluta de los filamentos de actina celulares y las demás proteínas involucradas en la formación del pedestal en la que Tir también juega un papel preponderante (Campellone *et al.* 2004).

El SST3 consiste en un canal proteico que se extiende desde la bacteria hacia la célula del hospedero, formado principalmente por la proteína EspA, y a través del cual se translocan las proteínas efectoras EspB, Tir, EspD, EspG, EspF, Map y EspM, entre otras (Fig. 6) (Ebel *et al.* 1998; Knutton *et al.* 1998). El mismo permite la adhesión del patógeno al epitelio intestinal bovino de la unión recto-anal (Naylor *et al.* 2005; Naylor *et al.* 2003). Se ha demostrado que la delección de genes que codifican componentes de este aparato reduce la colonización en el hospedador bovino (Dziva *et al.* 2004; Naylor *et al.* 2005).

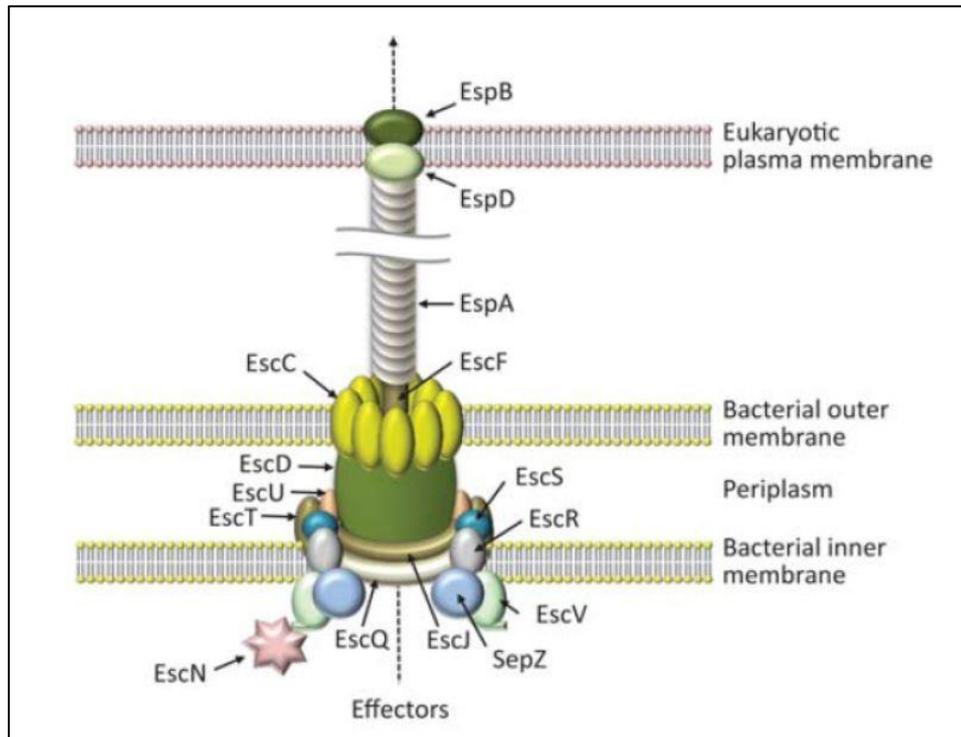


Figura 6: Representación esquemática del SST3. Figura tomada de Pallen *et al.* 2005.

Un aspecto interesante a destacar es que la expresión de los genes codificados en LEE y la correcta formación del pedestal en el epitelio intestinal se ven favorecidos cuando el patógeno se encuentra en el hospedador mamífero (Brady *et al.* 2011). Se ha determinado que la expresión de LEE es sensible a los niveles de catecolaminas del hospedador –niveles altos normalmente se asocian a condiciones de estrés-, hormonas que son censadas por receptores adrenérgicos bacterianos (Hughes y Sperandio 2008).

***Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC):** Este patotipo fue primeramente reconocido en 1983 como causa de enfermedad en humanos, asociado a diarrea y colitis hemorrágica, pudiendo llegar a comprometer la vida del paciente o dejando grandes secuelas a nivel renal y/o neurológico (Davis *et al.* 2014). Las cepas de EHEC se caracterizan por su capacidad de producir una o ambas toxinas Shiga, y la inducción de lesiones de tipo A/E en las células del epitelio intestinal (Obata y Obrig 2014). Al igual que el patotipo EPEC, EHEC tiene como principal reservorio el ganado bovino (Kaper *et al.* 2004).

Como todo patógeno intestinal, este patotipo debió adquirir mecanismos que le permitiesen sobrevivir al tránsito por el tracto digestivo. Elementos como el mucus intestinal o el ambiente ácido del estómago suelen ser algunas de las barreras inespecíficas a las que se deben enfrentar. Se han descrito 3 mecanismos de tolerancia de estas bacterias a la acidez. Uno de ellos, el sistema Gad dependiente de glutamato, provee un alto nivel de tolerancia a ácidos siendo fundamental en este aspecto para la llegada del patógeno a la unión recto anal en el ganado bovino (Price *et al.* 2004). Otro aspecto importante es la movilidad otorgada por los flagelos. Este factor de virulencia al igual que la formación de biofilms ven su expresión estimulada por las catecolaminas del hospedero (epinefrina y norepinefrina) y la molécula AI-3 del sistema de *quorum-sensing* (Bansal *et al.* 2007). No obstante su expresión esta finamente regulada. Una vez que EHEC se encuentra en el lugar adecuado y no se requiere mayormente de movilidad, existen mecanismos que reprimen la expresión de flagelos de forma de poder evitar el reconocimiento por el sistema inmune del hospedero. Componentes como la mucina producida por tejidos epiteliales disminuye la expresión de genes flagelares (Kim *et al.* 2012).

Tratamiento y prevención de la DNT

La fluidoterapia es la terapéutica de elección en toda diarrea, debido a que la mayoría de las muertes de terneros ocurren por la deshidratación y el desequilibrio electrolítico, y no como consecuencia directa de la multiplicación de los patógenos que la originan (Bilbao *et al.* 2012). Por lo tanto, bajo correctas prácticas de manejo y tratamiento y en animales no inmunosuprimidos, las infecciones con microorganismos comúnmente causantes de DNT suelen ser autolimitantes (Dirksen *et al.* 2005).

Tradicionalmente se solía recomendar el tratamiento con antibióticos y/o supresores de la motilidad intestinal, entre otros (Bilbao *et al.* 2012). En este último tiempo, la visión sobre dicha terapéutica, y principalmente su abordaje con antimicrobianos, ha dado lugar a controversia. El primer motivo es la polémica sobre si su uso verdaderamente contribuye a la recuperación del estado de salud o no, ya que hay estudios que indican que el uso de estos agentes lejos de producir una mejoría, producirían una disbacteriosis en el tracto gastrointestinal empeorando el cuadro diarreico (Rollin *et al.* 1986; Shull *et al.* 1978; Smith 2015; de Verdier *et al.*

2003; Grove-White 2004). El segundo de ellos, y aún más importante, es la creciente preocupación sobre la aparición de resistencia a estos antimicrobianos por su mal uso. Esto último no es un tema menor, por tratarse de una problemática que atañe directamente a la salud pública (Smith 2015; Constable 2004).

En tal sentido, con el objetivo de sustituir la antibioticoterapia, es que se han desarrollado ampliamente en este último tiempo el uso de probióticos. Los mismos colonizan la parte distal del intestino y de esta forma –entre otras- contribuyen en gran medida a impedir la infección por microorganismos patógenos (Uyeno *et al.* 2015)

Otro método que ha sido desarrollado para la prevención de la DNT, que también puede ser empleado en el tratamiento, es la complementación de la dieta láctea con anticuerpos de diferentes fuentes (Bilbao *et al.* 2012). Una alternativa muy promisoriosa para la obtención de anticuerpos específicos son las inmunoglobulinas de yema de huevo de gallina, la denominada Tecnología IgY (Bilbao *et al.* 2007). El procedimiento consiste en hiperinmunizar gallinas frente a los agentes etiológicos de DNT, lo que llevará a una producción y concentración de anticuerpos IgY (análogos a las IgG mamíferas) en la yema, para que luego de un proceso de extracción puedan ser incorporados a los sustitutos lácteos administrados al ternero (Bilbao *et al.* 2007).

A pesar de contar con herramientas para el tratamiento de la DNT, es reconocido que una de las mejores formas de reducir su incidencia es la prevención (Bilbao *et al.* 2012). En este sentido existen 3 principios básicos de control que deben ser aplicados: reducir el grado de exposición de los terneros neonatos a los agentes infecciosos mediante buenas práctica de manejo; proporcionar resistencia no específica máxima a través de un adecuado nivel nutricional y consumo de calostro; y aumentar la resistencia específica de los neonatos mediante la vacunación de las hembras gestantes (Odeón 2001).

Diagnóstico

Identificar la causa de cualquier enfermedad suele ser la piedra angular para poder establecer correctas medidas de prevención y tratamiento, y el caso de la DNT no es la excepción. En tal sentido, el diagnóstico se basa en la identificación de

él o los agentes causantes de DNT en muestras de materia fecal o en muestras de intestino obtenidas de necropsias (Odeón, 2001).

Los métodos mediante los cuales se realiza la identificación de los distintos agentes y las muestras empleadas se detallan en la Tabla 2.

Tabla 2: Métodos de detección y muestras empleadas para los principales agentes causantes de DNT. Abreviaciones: ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*); HP (Histopatología); AL (aglutinación en látex); PCR (*polymerase chain reaction*); ME (Microscopía electrónica). Modificado de Blanchard 2012. Diagnostics of Dairy and Beef Cattle Diarrhea.

Patógeno	Muestra	Método detección
ETEC	Heces y/o fracción de íleon y colon	ELISA; Cultivo; HP; AL; PCR
AEEC		HP; Cultivo; PCR
<i>Salmonella</i> spp.		Cultivo; PCR
<i>Clostridium perfringens</i>		ELISA; PCR
Coronavirus		HP; ELISA; ME; PCR
Rotavirus		ME; ELISA; AL; PCR
<i>Cryptosporidium</i> spp.		ELISA; PCR

Para el caso particular de *E. coli*, es conveniente tener en cuenta que las cepas causantes de diarrea crecen adheridas a la mucosa intestinal (Odeón, 2001), por lo que la prueba confirmatoria de DNT causada por este tipo de microorganismos es el examen microscópico de colon e intestino delgado (Blanchard 2012).

La técnica de PCR es muy utilizada en los laboratorios de diagnóstico debido a su sensibilidad (Blanchard 2012). También es una excelente herramienta de investigación que permite determinar fehacientemente la presencia del patógeno en las heces de animales provenientes de distintos rodeos y regiones (Blanchard 2012; Nguyen *et al.* 2010; Ok *et al.* 2009).

Para profundizar en la caracterización de *E. coli* causante de brotes de DNT, es importante estudiar la diversidad inter e intra-específica así como la estructura poblacional. Con este fin en la actualidad se emplean distintas técnicas, como por

ejemplo *rep*-PCR, MLST, DGGE y PFGE (Malak *et al.* 2008; Foley *et al.* 2009; Singh *et al.* 2015; Maiden *et al.* 1998).

En particular, la técnica de *fingerprinting* MLST (*Multilocus Sequence Typing*) es una técnica robusta de alta reproducibilidad que permite estudiar la variabilidad de los genomas microbianos (Foley *et al.* 2009; Singh *et al.* 2015). Esta provee buenas aproximaciones genealógicas en estudios de diversidad de *E. coli* en base a múltiples marcadores genéticos independientes (Pérez-Losada *et al.* 2013). La técnica utiliza un grupo de genes denominados *housekeeping* o de expresión constitutiva, cuya pequeña variación en la secuencia nucleotídica permite establecer relaciones filogenéticas entre cepas bacterianas (Maiden *et al.* 1998). Una de las fortalezas de esta técnica radica en que emplea fragmentos cortos de estos genes, lo que le permite sortear las complicaciones inherentes a las recombinaciones que se puedan dar en el genoma (Maiden *et al.* 1998). De acuerdo al perfil alélico obtenido luego de analizados todos los genes, un secuenciotipo (ST) es asignado a cada cepa a partir de los cuales se realizan los análisis filogenéticos. En caso de no corresponderse con ningún ST de los registrados en la base de datos, se le puede asignar uno nuevo (Foley *et al.* 2009). A su vez, cada ST puede clasificarse en complejos de ST. Los mismos son agrupamientos de ST que comparten 6 o más alelos de los genes evaluados (Wirth *et al.* 2006). Este agrupamiento aporta información valiosa, pues se ha descrito que los aislamientos que comparten el complejo de ST también tienen en común similares características de virulencia (Wirth *et al.* 2006).

Los métodos de análisis de datos empleados en MLST pueden ser clasificados en 2 grandes grupos: aquellos que emplean la designación de STs para estimar las relaciones entre aislamientos; y aquellos que emplean directamente las secuencias nucleotídicas a tales efectos (Pérez-Losada *et al.* 2013). Los métodos basados en ST tienen la ventaja de ser simples y rápidos, y por lo tanto es más oportuno su uso diagnóstico en programas de vigilancia epidemiológica y salud pública (Pérez-Losada *et al.* 2013).

HIPÓTESIS

E. coli es un patógeno causante de DNT en Uruguay, cuyas cepas circulantes se pueden adscribir a distintos patotipos que presentan asociaciones con distintas variables epidemiológicas.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la presencia de los patotipos STEC, EHEC y EPEC de *E. coli* causante de DNT, mediante la técnica de PCR convencional en una colección de aislamientos obtenidos de heces de terneros de diferentes regiones de Uruguay, al igual que la diversidad y relaciones filogenéticas de una selección de dichos aislamientos por medio de MLST.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Puesta a punto de la técnica de PCR convencional y determinación de la presencia de los genes *eae*, *stx1* y *stx2*.
2. Confirmar la identidad de las secuencias de los genes amplificados mediante herramientas bioinformáticas.
3. Puesta a punto de la técnica de PCR convencional para cada uno de los genes *housekeeping* a evaluar mediante MLST.
4. Secuenciación y edición de las secuencias obtenidas a partir de las amplificaciones parciales de cada gen *housekeeping*.
5. Asignación de las cepas a ST conocidos o generación de nuevos ST de *E. coli*.
6. Evaluación de las relaciones filogenéticas y diversidad de la colección.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Aislamientos bacterianos

Para los análisis de la presencia de genes de virulencia se empleó una colección de 303 aislamientos de *E. coli* previamente identificados y caracterizados en el Departamento de Microbiología del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable. Todos los aislamientos fueron obtenidos a partir de cultivos de heces de terneros que presentaban algún síntoma de diarrea o de terneros sanos durante el período 2012-2014, y provinieron de distintos establecimientos ganaderos de los Departamentos de Colonia, Florida, San José, Tacuarembó, Soriano, Canelones, Paysandú y Artigas. Los aislamientos originarios del Departamento de Artigas fueron obtenidos de animales de 6 meses, que si bien no pertenecen a la categoría de terneros neonatos, fueron incluidos en el análisis dado la gravedad del caso y los antecedentes de muertes por DNT en dicho establecimiento.

Para la identificación de secuenciotipos mediante *fingerprinting* MLST, a partir de la colección de 303 aislamientos antes mencionada, se seleccionaron 22 de ellos teniendo en cuenta sus propiedades de virulencia, estado del animal del cual provinieron los aislamientos (presencia o ausencia de síntomas de DNT), sistema de cría, origen geográfico, y diversidad de los mismos estudiada previamente mediante la técnica de *rep*-PCR. El detalle de la selección se muestra en la Tabla 3.

Los genes de virulencia empleados para la selección de los aislamientos fueron los siguientes: *clpg* que codifica para la adhesina no fimbrial CS31A, *f17A* que codifica la subunidad estructural de la fimbria F17, *f17G(I)* que codifica la adhesina F17 (subfamilia I), *f17G(II)* que codifica la adhesina F17 (subfamilia II), *eae* que codifica la proteína de membrana externa intimina, *stx1/stx2* que codifican las toxinas Shiga tipo 1/tipo 2, *sta* que codifica la enterotoxina termoestable, *elt* que codifica la enterotoxina termolabil y *f5* que codifica la fimbria F5.

Tabla 3: Aislamientos seleccionados para MLST donde se muestran sus atributos de virulencia, origen geográfico, año de colecta y características del animal del que fueron obtenidos.

Aislamiento	Origen	Signos	Foco	Fecha	Genes de virulencia										
					<i>clpG</i>	<i>f17A</i>	<i>f17G(II)</i>	<i>f17G(I)</i>	<i>eae</i>	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>sta</i>	<i>elt</i>	<i>f5</i>	
6.2	Colonia	Si	No	2012											x
7.4	Florida	Si	Si	2012											x
8.1	Florida	Si	Si	2012	x	x	x						x	x	
14.3	San José	No	No	2012		x	x								x
21.1	Colonia	Si	Si	2012		x	x								
28.1	Tacuarembó	Si	No	2012		x	x								
36.4	Canelones	No	No	2013						x					
42.3	San José	Si	No	2013									x	x	
48.1	Soriano	Si	Si	2013	x	x		x							
51.2	Colonia	Si	Si	2013	x										
52.3	Colonia	Si	Si	2013		x	x								
53	Colonia	Necropsia	Si	2013											
55.1	San José	Si	No	2013									x	x	
56.1	San José	Si	No	2013		x	x						x		
57.1	Paysandú	No	No	2013		x	x						x		
59.1	Paysandú	No	No	2013	x	x	x								
64.2	Paysandú	Si	No	2013	x	x	x								
67.1	Canelones	Si	Si	2013						x					
74.1	Artigas	Si	Si	2014						x	x				
74.3	Artigas	Si	Si	2014		x	x								

Condiciones de cultivo y extracción de ADN

El cultivo rutinario de los aislamientos de *E. coli* se realizó en el medio Triptosa Soya Agar (TSA) a 37°C durante 24 hs.

La extracción de ADN de cada aislamiento se realizó resuspendiendo una colonia aislada en 50 µL de agua destilada e hirviendo la muestra durante 10 minutos a 100°C (método de lisis térmica). La concentración de ADN total obtenida se determinó mediante Nanodrop (Thermo).

PCR convencional y visualización de los productos por electroforesis en gel de agarosa

Genes de virulencia

Se puso a punto la técnica de PCR convencional para la amplificación parcial del gen *eae*, descrita por Batchelor y colaboradores (1999) y para los genes *stx1* y *stx2* detallada por Cebula y colaboradores (1995).

La mezcla de reacción para la amplificación de cada gen consistió en: 2,5 µL de *buffer* para PCR 10X (concentración final 1X), 2,5 µL de MgCl₂ 25 mM (concentración final 3 mM), 0,5 µL de dNTPs 10 mM (concentración final 0,2 mM), 0,2 µL de Taq DNA Polimerasa 5 U/ µL Invitrogen (concentración final 1U/ µL), 16,55 µL de H₂O para PCR estéril, 2,5 µL de ADN (concentración final 5ng/ µL), 0,125 µL de los cebadores para el gen correspondiente (concentración final 0,1 µM), en un volumen final de 25 µL.

El protocolo de ciclado para los 3 genes consistió en un paso inicial de 5 min a 94°C; 30 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 53°C (temperatura de *annealing*) y 1 min a 72°C; seguidos de un paso de extensión de 5 min a 72°C. Las secuencias de los cebadores empleados y el tamaño de los amplicones se detallan en la Tabla 4.

Como control positivo para los 3 genes se empleó el control comercial DEC primer mix (Statens Serum Institut).

Tabla 4: Cebadores para cada uno de los genes, tamaño de los amplicones esperados.

Gen	Cebador	Secuencia (5'--- 3')	Posición	Tamaño (pb)	Referencia
<i>eae</i>	eae-F	GGGATCGATTACCGTCAT	26010 - 26027	837	(Batchelor <i>et al.</i> 1999)
	eae-R	TTTATCAGCCTTAATCTC	26832 - 26847		
<i>stx1</i>	stx1-F	CAGTTAATGTGGTGGCGAAGG	213 - 232	348	(Cebula <i>et al.</i> 1995)
	stx1-R	CACCAGACAATGTAACCGCTG	538 - 559		
<i>stx2</i>	stx2-F	ATCCTATTCCCGGGAGTTTACG	295 - 316	584	(Cebula <i>et al.</i> 1995)
	stx2-R	GCGTCATCGTATACACAGGAGC	859 - 881		

Luego de ejecutada la corrida de PCR, una alícuota de cada muestra se analizó mediante electroforesis en geles de agarosa a una concentración de 1 %. Los productos de amplificación se tiñeron con GelRed (Biotum, USA) y se observaron bajo luz UV.

Multilocus Sequence Typing (MLST)

La técnica MLST se realizó en base al protocolo desarrollado por Wirth y colaboradores (2006). Para esto se puso a punto la técnica de PCR convencional para la amplificación parcial de cada uno de los genes *housekeeping* seleccionados (*adhA*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA* y *recA*) utilizando los cebadores disponibles en la base de datos de MLST para *E. coli* de la Universidad de Warwick (<http://mlst.warwick.ac.uk>) cuya secuencia se muestra en la Tabla 5.

Cada mezcla de reacción consistió en 5,0 µL de *Buffer* para PCR 10X (concentración final 1X), 2,0 µL de MgCl₂ 25 mM (concentración final 2 mM), 1,0 µL de dNTPs 10 mM (concentración final 0,2 mM), 0,25 µL (5U) de Taq DNA Polimerasa (Invitrogen), 32,75 µL de H₂O para PCR estéril, 4,0 µL de ADN, 2,5 µL de los cebadores específicos 10,0 µM del gen a ensayar (concentración final 0,5 µM), en un volumen final de 50 µL.

El protocolo de ciclado consistió en un paso inicial de 1 min a 94°C; 30 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a la correspondiente temperatura de *annealing* (dependiendo del gen a ensayar) y 1 min a 72°C, seguidos de un paso de 10 min a 72°C. La temperatura de *annealing* de los cebadores para los genes evaluados se detalla en la Tabla 5. Luego de cada corrida de PCR, y para corroborar la correcta amplificación, una alícuota de cada producto se analizó en geles de agarosa 1 %, teñidos con GelRed (Biotum, USA) y observados bajo luz UV.

Tabla 5: Cebadores empleados para la amplificación parcial de los genes requeridos para la técnica de MLST.

Gen	Cebadores (5' - 3')	Tamaño del amplicón	Temperatura de annealing
<i>adk</i>	F 5'-ATTCTGCTTGGCGCTCCGGG-3' R 5'-CCGTCAACTTTCGCGTATTT-3'	583 pb	56°C
<i>fumC</i>	F 5'-TCACAGGTGCGCCAGCGCTTC-3' R 5'-GTACGCAGCGAAAAAGATTC-3'	806 pb	64°C
<i>gyrB</i>	F 5'-TCGGCGACACGGATGACGGC-3' R 5'-ATCAGGCCTTCACGCGCATC-3'	911 pb	64°C
<i>icdF</i>	F 5'-ATGGAAAGTAAAGTAGTTGTTCCGGCACA-3' R 5'-GGACGCAGCAGGATCTGTT-3'	878 pb	54°C
<i>mdh</i>	F 5'-AGCGCGTTTCTGTTCAAATGC-3' R 5'-CAGGTTCAGAACTCTCTCTGT-3'	932 pb	60°C
<i>purA</i>	F 5'-CGCGCTGATGAAAGAGATGA-3' R 5'-CATACGGTAAGCCACGCAGA-3'	816 pb	64°C
<i>recA</i>	F 5'-CGCATTCGCTTTACCCTGACC-3' R 5'-TCGTTCGAAATCTACGGACCGGA-3'	780 pb	56°C

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

Genes de virulencia

Para corroborar que los productos de PCR correspondieran al gen de interés, fragmentos de ADN amplificados se enviaron a secuenciar a MACROGEN (Seúl, República de Corea). Las secuencias obtenidas se analizaron y editaron mediante el uso del programa informático BioEdit (versión 7.5.0.3) confirmándose la identidad de las mismas mediante un BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) en la base de datos pública NCBI (National Center for Bio**te**chnology Information).

Multilocus Sequence Typing

Una vez verificada la correcta amplificación de los genes, los productos de PCR fueron enviados a MACROGEN (Seúl, República de Corea) donde fueron purificados y secuenciados.

Las secuencias obtenidas de los 7 genes fueron editadas y analizadas mediante el programa informático BioEdit (versión 7.5.0.3) según las recomendaciones proporcionadas en el sitio web de MLST (<http://mlst.warwick.ac.uk>) para determinar los alelos de cada gen. En aquellos casos en que todos los alelos de esa cepa estuviesen previamente descritos y registrados, se le fue asignado automáticamente un ST conocido al aislamiento. Por otro lado, cuando la combinación de alelos conocidos no estaba presente, a nuestros aislamientos se les asignó un nuevo ST.

El resumen de lo anteriormente dicho para los 22 aislamientos evaluados se muestra en la Tabla 8.

Relaciones filogenéticas

Multilocus Sequence Typing

El análisis filogenético de los aislamientos se realizó mediante el concatenado de las secuencias de los 7 genes *housekeeping* estudiados. A tales efectos primeramente se ejecutó un alineamiento múltiple mediante el empleo del programa MEGA (versión 6.06), el que luego fue utilizado para la realización de los dendogramas. Para la construcción de dicho dendograma se utilizó el método de *Neighbor-Joining* con un número de replicaciones de *bootstrap* de 1000 (Tartof *et al.* 2005).

RESULTADOS

Determinación de la presencia del gen *eae* mediante PCR convencional

Se puso a punto la técnica de PCR para la amplificación del gen *eae*, obteniéndose una banda del tamaño esperado, en el entorno de los 837 pb, en un gel de agarosa al 1 %.

De un total de 303 aislamientos analizados, se obtuvieron 8 presuntamente positivos, los cuales se observan en el gel de agarosa de la fig. 7.

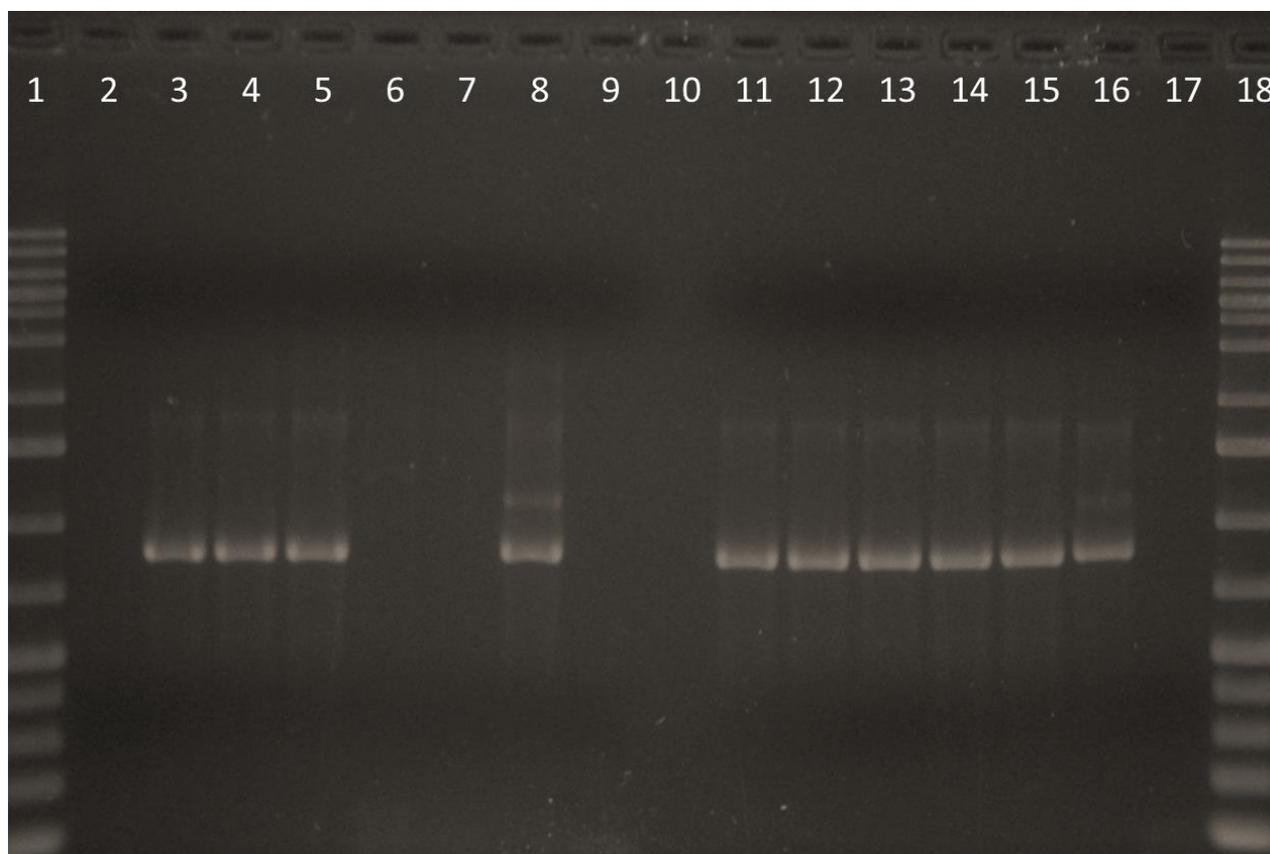


Figura 7: Electroforesis en gel de agarosa al 1 % teñido con Gel Red. Carril 1 y 18: marcador de peso molecular (1 Kb Plus – Thermo); carriles 3, 4, 5, 11, 12, 13, 14 y 15: muestras positivas para el gen *eae*; carriles 8 y 16: control positivo; carril 17: control negativo.

Determinación de la presencia del gen *stx1* mediante PCR convencional

Al igual que en caso del gen *eae*, se pudo poner a punto la técnica de PCR convencional para el gen *stx1*, verificándose la aparición de una banda de tamaño aproximado de 348 pb. Del total de aislamientos estudiados, solamente 2 de ellos aparecieron como presuntamente positivos para el gen *stx1*, los mismos se observan en los carriles 7 y 8 de la electroforesis de la fig. 8. Estos aislamientos también están comprendidos entre los 8 que arrojaron un resultado positivo para el gen que codifica para la intimina, y fueron aislados de un mismo animal en el departamento de Artigas.

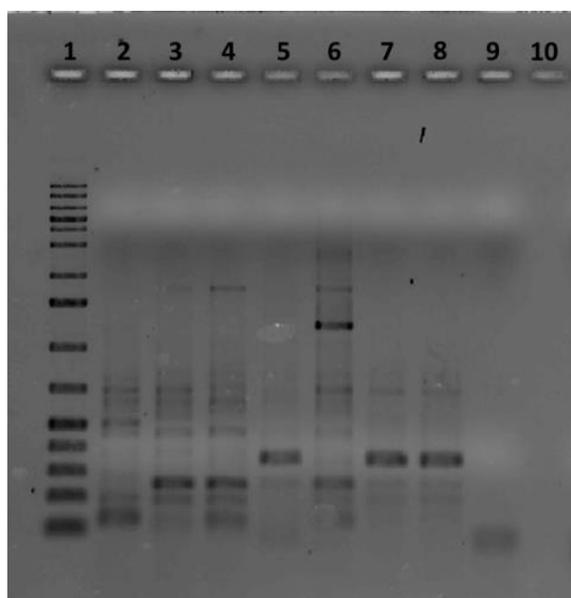


Figura 8: Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con Gel Red. Carril 1: marcador de peso molecular (1 Kb Plus – Thermo); carriles 7 y 8: muestras positivas para *stx1*; carriles 2, 3 y 4: muestras negativas; carril 5: control positivo; carril 9: control negativo.

Determinación de la presencia del gen *stx2* mediante PCR convencional

Se pudo realizar la puesta a punto del PCR convencional para el gen *stx2*, corroborando la aparición de una banda en el entorno de los 584 pb en el control positivo (DEC primer mix). No obstante, y al igual que para la variante 1 de esta

toxina, se observa un gran número de bandas inespecíficas las cuales no pudieron ser eliminadas por medio del ajuste de los protocolos de PCR.

A diferencia de lo observado para los anteriores genes evaluados, en este caso no se observaron muestras positivas con los cebadores empleados.

Análisis de secuencias

Una vez que contamos con las secuencias de nuestros productos de PCR purificados, se realizó la edición de las mismas con el programa informático Bioedit. En tal sentido se verificó la calidad de la señal de secuenciación al mismo tiempo que se buscó, a partir de las secuencias obtenidas con los cebadores F y R, generar una secuencia consenso para analizar por BLAST (Fig. 9). Los aislamientos positivos confirmados por secuenciación se detallan en la Tabla 6.

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Escherichia coli strain FORC_028_complete genome	1306	1306	100%	0.0	99%	CP012893.1
Escherichia coli strain EP049_beta1_intimin (eae) gene, complete cds	1306	1306	100%	0.0	99%	KT591229.1
Escherichia coli strain EP057_beta1_intimin (eae) gene, complete cds	1306	1306	100%	0.0	99%	KT591228.1
Escherichia coli strain EP073_beta1_intimin (eae) gene, complete cds	1306	1306	100%	0.0	99%	KT591226.1
Escherichia coli strain EP095_beta1_intimin (eae) gene, complete cds	1306	1306	100%	0.0	99%	KT591223.1
Escherichia coli strain EP105_beta1_intimin (eae) gene, complete cds	1306	1306	100%	0.0	99%	KT591222.1
Escherichia coli strain EP115_beta1_intimin (eae) gene, complete cds	1306	1306	100%	0.0	99%	KT591221.1
Escherichia coli strain EP139_beta1_intimin (eae) gene, complete cds	1306	1306	100%	0.0	99%	KT591218.1
Escherichia coli strain EP140_beta1_intimin (eae) gene, complete cds	1306	1306	100%	0.0	99%	KT591217.1
Escherichia coli strain EP143_beta1_intimin (eae) gene, complete cds	1306	1306	100%	0.0	99%	KT591215.1
Escherichia coli strain EP148_beta1_intimin (eae) gene, complete cds	1306	1306	100%	0.0	99%	KT591214.1
Escherichia coli strain EP172_beta1_intimin (eae) gene, complete cds	1306	1306	100%	0.0	99%	KT591213.1
Escherichia coli strain EP254_beta1_intimin (eae) gene, complete cds	1306	1306	100%	0.0	99%	KT591208.1
Escherichia coli strain EP266_beta1_intimin (eae) gene, complete cds	1306	1306	100%	0.0	99%	KT591202.1
Escherichia coli strain EP281_beta1_intimin (eae) gene, complete cds	1306	1306	100%	0.0	99%	KT591200.1
Escherichia coli strain EP290_beta1_intimin (eae) gene, complete cds	1306	1306	100%	0.0	99%	KT591199.1
Escherichia coli strain EP292_beta1_intimin (eae) gene, complete cds	1306	1306	100%	0.0	99%	KT591198.1
Escherichia coli strain EP294_beta1_intimin (eae) gene, complete cds	1306	1306	100%	0.0	99%	KT591197.1
Escherichia coli genome assembly FH170_scaffold scaffold-30_contig-10.0_1_250444 [organism:Escherichia]	1306	1306	100%	0.0	99%	LM8967125.1
Escherichia coli genome assembly FH18_scaffold scaffold-27_contig-6.0_1_326207 [organism:Escherichia]	1306	1306	100%	0.0	99%	LM8966749.1
Escherichia coli genome assembly FH179_scaffold scaffold-22_contig-6.4_25117_356769 [organism:Escherichia]	1306	1306	100%	0.0	99%	LM8966694.1
Escherichia coli genome assembly FH163_scaffold scaffold-33_contig-10.0_1_187616 [organism:Escherichia]	1306	1306	100%	0.0	99%	LM8966450.1

Figura 9: Resultado ilustrativo de un BLAST. A la izquierda se detalla el nombre del microorganismo y el gen al que corresponde; a la derecha se observa el porcentaje de cobertura de la secuencia y el porcentaje de identidad. Fuente: NCBI

Tabla 6: Resumen de los aislamientos positivos para los genes *eae*, *stx1* y *stx2* confirmados por secuenciación.

Aislamientos positivos confirmados por secuenciación			
Aislamiento/Gen	<i>eae</i>	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>
36.4	+	-	-
36.5A	+	-	-
36.5B	+	-	-
67.1	+	-	-
67.2	+	-	-
67.3	+	-	-
74.1	+	+	-
74.2	+	+	-

Tabla 7: Principales características de los aislamientos positivos para los genes evaluados y su correspondencia con patotipos. Abreviaciones: S (Sano), DM (Diarrea Moderada), DG (Diarrea Grave).

Aislamiento	Año de colecta	Signos de diarrea	Edad (días)	Foco	Origen	Patotipo	% del total de aislamientos analizados
36.4	2013	S	20	No	Canelones	EPEC	1,98
36.5A	2013	S	20	No	Canelones		
36.5B	2013	S	20	No	Canelones		
67.1	2013	DM	7	No	Canelones		
67.2	2013	DM	7	No	Canelones		
67.3	2013	DM	7	No	Canelones		
74.1	2014	DG	180	Si	Artigas	EHEC	0,66
74.2	2014	DG	180	Si	Artigas		

Puesta a punto de la técnica de PCR convencional para 7 genes *housekeeping* de *E. coli*

Se puso a punto la técnica de PCR convencional para los 7 genes (*adh*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA* y *recA*) siguiendo los lineamientos señalados por Wirth *et al.* 2006. En concordancia con lo establecido en el protocolo original, se verificó la amplificación específica de los genes mediante la observación de una sola banda del tamaño esperado en geles de agarosa 1 %.

Secuenciación y edición de las secuencias obtenidas a partir de las amplificaciones parciales de cada gen

Una vez que se contó con los 7 productos de PCR para cada aislamiento, los mismos fueron enviados a MACROGEN para su purificación y secuenciación. En una primera instancia, las secuencias obtenidas con los cebadores F y R fueron editadas con el programa BioEdit, el que permitió generar una secuencia consenso para el posterior análisis por BLAST, confirmando así su identidad (Fig. 10).

Description	adk					Accession
	Match	score	cover	value	Ident	
<input type="checkbox"/> Escherichia coli strain YD786, complete genome	990	990	100%	0.0	100%	CP013112.1
<input type="checkbox"/> Escherichia coli ACN001, complete genome	990	990	100%	0.0	100%	CP007442.1
<input type="checkbox"/> Escherichia coli strain C43(DE3), complete genome	990	990	100%	0.0	100%	CP011938.1
<input type="checkbox"/> Escherichia coli strain 94-3024, complete genome	990	990	100%	0.0	100%	CP009106.2
<input type="checkbox"/> Shigella flexneri G1663, complete genome	990	990	100%	0.0	100%	CP007037.1
<input type="checkbox"/> Escherichia coli strain CFSAN029787, complete genome	990	990	100%	0.0	100%	CP011416.1
<input type="checkbox"/> Escherichia coli strain SEC470, complete genome	990	990	100%	0.0	100%	CP007594.1
<input type="checkbox"/> Escherichia coli O104:H4 str. C227-11, complete genome	990	990	100%	0.0	100%	CP011331.1
<input type="checkbox"/> Escherichia coli strain CI5, complete genome	990	990	100%	0.0	100%	CP011018.1
<input type="checkbox"/> Escherichia coli strain BL21 (Takara), complete genome	990	990	100%	0.0	100%	CP010816.1
<input type="checkbox"/> Escherichia coli ECC-1470, complete genome	990	990	100%	0.0	100%	CP010344.1
<input type="checkbox"/> Escherichia coli strain C41(DE3), complete genome	990	990	100%	0.0	100%	CP010585.1
<input type="checkbox"/> Escherichia coli O157:H16 strain Santai, complete genome	990	990	100%	0.0	100%	CP007592.1
<input type="checkbox"/> Escherichia coli strain 789, complete genome	990	990	100%	0.0	100%	CP010315.1
<input type="checkbox"/> Escherichia coli HUSEC2011 complete genome	990	990	100%	0.0	100%	HF572917.2
<input type="checkbox"/> Escherichia coli strain RM9387, complete genome	990	990	100%	0.0	100%	CP009104.1
<input type="checkbox"/> Escherichia coli strain APp10510_Tm14 adenylate kinase (adk) gene, partial cds	990	990	100%	0.0	100%	KF914276.1
<input type="checkbox"/> Escherichia coli strain APp10510_Sm9 adenylate kinase (adk) gene, partial cds	990	990	100%	0.0	100%	KF914271.1
<input type="checkbox"/> Escherichia coli strain APp10510_Am29 adenylate kinase (adk) gene, partial cds	990	990	100%	0.0	100%	KF914268.1
<input type="checkbox"/> Escherichia coli strain APp10510_Am5 adenylate kinase (adk) gene, partial cds	990	990	100%	0.0	100%	KF914265.1
<input type="checkbox"/> Escherichia coli strain APp10510_Am1 adenylate kinase (adk) gene, partial cds	990	990	100%	0.0	100%	KF914264.1
<input type="checkbox"/> Shigella flexneri genome assembly NCTC1, chromosome_1	990	990	100%	0.0	100%	LM651928.1
<input type="checkbox"/> Escherichia coli genome assembly FHI97, scaffold scaffold-39_contig-6.0_1_303098 [organism:Escherichia	990	990	100%	0.0	100%	LM997226.1
<input type="checkbox"/> Escherichia coli genome assembly FHI89, scaffold scaffold-21_contig-0.0_1_1374643 [organism:Escherichia	990	990	100%	0.0	100%	LM997040.1
<input type="checkbox"/> Escherichia coli genome assembly FHI85, scaffold scaffold-33_contig-0.0_1_815899 [organism:Escherichia	990	990	100%	0.0	100%	LM996975.1

Figura 10: Resultado representativo del análisis de BLAST realizado con una de las secuencias del gen *adk*.

Asignación de ST o generación de nuevos ST de *E. coli*

De los 22 aislamientos evaluados, 18 presentaron 7 alelos conocidos y registrados en la base de datos (Tabla 8). Los restantes 4 aislamientos evidenciaron secuencias notoriamente distintas a las registradas, lo que ameritará el análisis por parte de los curadores de dicha base, para su incorporación como nuevas variantes (pendiente de realización).

Con respecto a la asignación de los ST, 14 de los aislamientos estudiados evidenciaron combinaciones alélicas ya descritas y por tanto ST conocidos. Cabe mencionar que 2 de los aislamientos analizados se correspondieron con el ST 101, lo que reduce a 13 el número de ST. En estos casos se incorporaron a la base de datos como nuevas cepas dentro de los ST ya registrados.

Por otro lado, si bien los 4 aislamientos restantes presentaban alelos conocidos mostraron un perfil alélico no descrito hasta el momento. Por esta razón se asignaron nuevos ST a nuestros aislamientos denominados ST5846 (53),

ST5849 (55.1), ST5851 (57.1) y ST5852 (69.2). De esta forma totalizan 17 los ST distintos encontrados entre los aislamientos analizados.

Finalmente, los aislamientos 21.1, 36.4, 67.1 y 71.1 no pudieron ser clasificadas debido a que los alelos de los genes *adk* y *fumC* no han sido reportados hasta el momento en ningún estudio. Para su reconocimiento y designación como nuevos ST se deberán realizar 3 nuevos procesos de secuenciación independientes.

En lo que respecta a los complejos de ST, se encontraron un total de 7 complejos diferentes, mientras que los restantes aislamientos no presentaron uno definido (Tabla 9).

Tabla 8: Muestras, alelos de los genes estudiados, ST obtenidos y nueva nomenclatura asignada a los aislamientos incorporados a la base de datos. Las filas resaltadas en negrita corresponden a los aislamientos cuyo ST está pendiente de determinación. En negrita cursiva y celda sombreada se muestran aquellos ST descritos como nuevos y su respectiva nomenclatura en la base de datos.

Muestra	Gen							ST	Cepas incorporadas a la base de datos
	<i>adk</i>	<i>fumC</i>	<i>gyrB</i>	<i>icd</i>	<i>mdh</i>	<i>purA</i>	<i>recA</i>		
6.2	6	19	32	26	11	8	6	ST4467	6_2UY
7.4	9	65	5	1	9	13	6	ST162	7_4UY
8.1	21	35	27	6	5	5	4	ST69	8_1UY
14.3	6	4	32	185	24	13	7	ST1086	14_3UY
21.1	-----	4	4	16	24	8	14	-----	-----
28.1	6	4	4	18	24	5	14	ST56	28_1UY
36.4	-----	4	12	16	9	7	7	-----	-----
42.3	62	372	17	31	5	5	4	ST2449	42_3UY
48.1	83	23	164	181	80	1	42	ST1140	48_1UY
51.2	62	100	17	31	5	5	4	ST362	51_2UY
52.3	99	6	33	33	24	8	7	ST453	52_3UY
53	10	11	15	8	8	8	2	ST5846	53UY
55.1	10	11	4	131	8	8	2	ST5849	55_1UY
56.1	9	4	33	18	11	8	6	ST336	56_1UY
57.1	9	6	33	18	24	8	7	ST5851	57_1UY
59.1	43	41	15	18	11	7	6	ST101	59_1UY
64.2	43	41	15	18	11	7	6	ST101	64_2UY
67.1	-----	372	12	131	9	7	7	-----	-----
69.2	9	6	33	8	24	7	7	ST5852	69_2UY
71.1	6	-----	5	1	8	18	2	-----	-----
74.1	16	4	12	16	9	7	7	ST21	74_1UY
74.3	80	186	54	10	143	35	47	ST1087	74_3UY

Tabla 9: Complejos de ST encontrados entre los aislamientos analizados.

Aislamiento	ST	Complejo de ST
7.4	162	469
8.1	69	69
28.1	56	155
52.3	453	86
56.1	336	278
59.1	101	101
64.2	101	101
74.1	21	29

Evaluación de las relaciones filogenéticas y diversidad de la colección.

Para estudiar las relaciones filogenéticas entre los aislamientos se construyó un dendograma con las secuencias concatenadas de los 7 genes; el resultado se observa en la fig. 11.

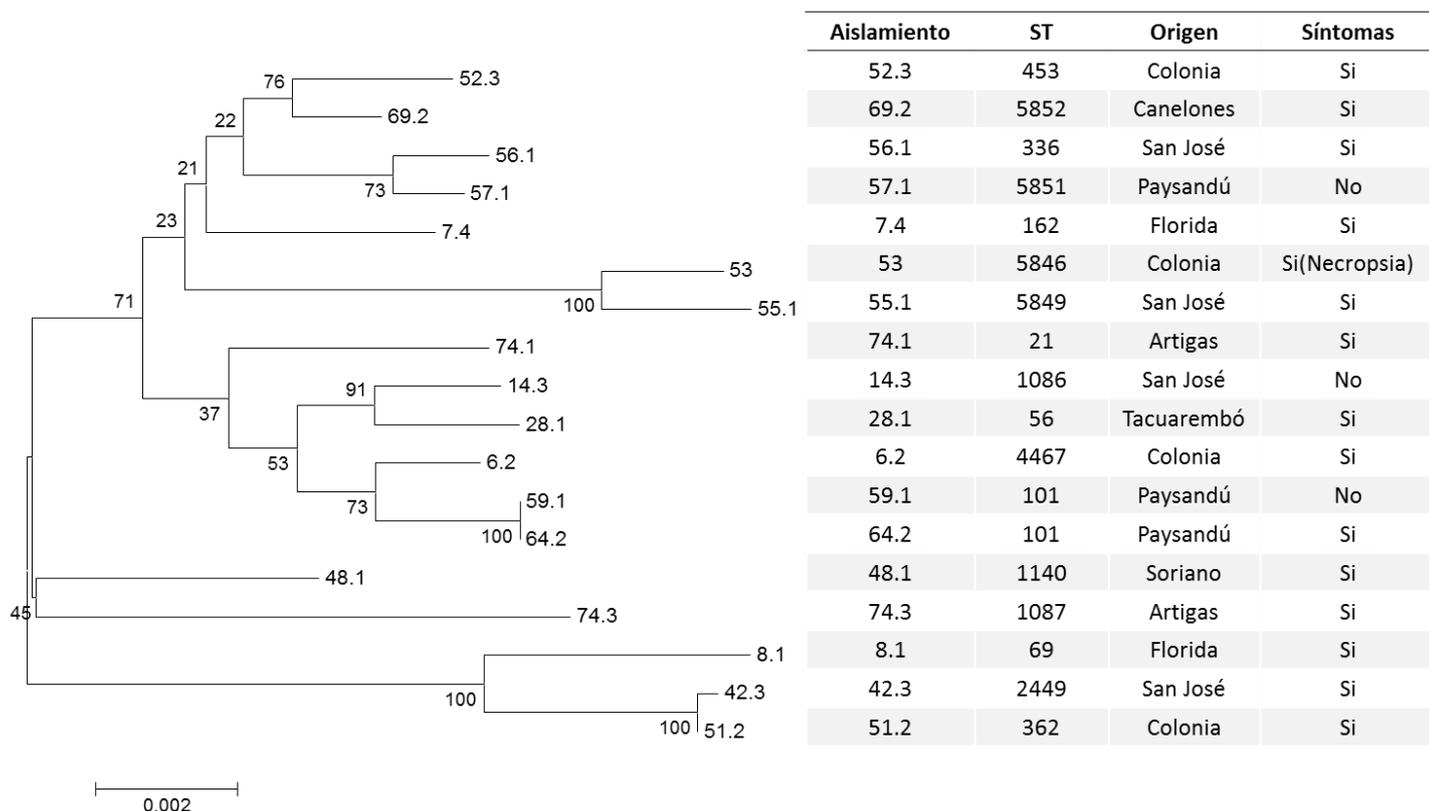


Figura 11: Dendograma obtenido con el método de *neighbor-Joining* y un número de 1000 réplicas de *bootstrap*. Como forma de facilitar su interpretación y comparación entre ST se incorpora una tabla con información de los mismos.

En primer lugar se puede destacar la gran heterogeneidad en el agrupamiento de los distintos aislamientos, lo que es compatible con la diversidad de ST observada en este trabajo.

De acuerdo a lo observado, los aislamientos 8.1, 42.3 y 51.1, correspondientes a departamentos de la cuenca lechera de nuestro país se agrupan juntos. Por otra parte aislamientos de zonas muy diferentes provenientes de San José y Paysandú como 56.1 y 57.1 también se ubican en una misma rama del

dendograma. Al mismo tiempo se puede ver que animales sanos y con síntomas de la enfermedad presentan secuencias muy similares, por ejemplo los aislamientos 59.1 y 64.2, 56.1 y 57.1, 14.3 y 28.1. Un caso particular lo constituyen los aislamientos 59.1 y 64.2 que se agrupan juntos, ambos corresponden al ST101 y al mismo establecimiento ganadero en Paysandú, el primero de ellos proveniente de un animal sin síntomas y el último de un animal con síntomas de DNT.

Otro aspecto a destacar es que del total de ST encontrados, 4 han sido descritos exclusivamente en muestras de origen animal, ya sea en individuos sanos (ST56) o aislados de casos de mastitis y septicemia (ST1086, ST1087 y ST1140). Los restantes 9 ST han sido asociados a enfermedad en animales y los seres humanos, además de aislamientos provenientes de muestras de agua. Ellos son: ST21, ST69, ST101, ST162, ST336, ST362, ST453, ST2449 y ST4467. Entre los nombrados anteriormente se destacan el ST21 que involucra cepas altamente virulentas en humanos y animales, y los ST69 y ST336 asociados a enfermedades del tracto urinario en humanos.

DISCUSIÓN

En este trabajo se logró determinar la presencia de 3 de los patotipos de *E. coli* diarreogénicos STEC, EHEC y EPEC considerados hasta el momento emergentes o con alta prevalencia en los rodeos ganaderos a nivel mundial (Kolenda *et al.* 2015). Respecto a esto, los resultados son por demás contundentes acerca de la presencia de estos en las explotaciones ganaderas de nuestro país (Tabla 7).

Se observó que un 1,98 % de los aislamientos analizados corresponden al patotipo EPEC, un 0,66 % al EHEC y ninguno de ellos a STEC. Esto contrasta con lo reportado por estudios contemporáneos realizados en otras partes del mundo e incluso con estudios en países de la región como Argentina, donde la prevalencia de estos patotipos es mayor (Blanco *et al.* 2004; Timm *et al.* 2007). Asimismo, los resultados obtenidos en este trabajo se encuentran en concordancia con lo descrito en estudios de meta-análisis. En éstos se señala que de un tiempo a esta parte se ha producido una disminución en la prevalencia, principalmente de STEC, cuya causa no tiene explicación visible hasta el momento (Kolenda *et al.* 2015).

En cuanto a la relación entre los signos clínicos reportados y los patotipos encontrados, se observó la ocurrencia de aislamientos que codifican genes de virulencia en animales clínicamente sanos. En este caso los resultados se encuentran en sintonía con lo reportado por otros investigadores (Blanco *et al.* 2004; Timm *et al.* 2007). En este aspecto, algunos estudios cuestionan el papel patogénico en bovinos de los patotipos STEC, EHEC y EPEC por no haber encontrado asociaciones significativas entre su presencia en terneros diarreicos respecto a terneros sanos, incluso reportando en algunos casos una mayor presencia de estos en animales asintomáticos (Kolenda *et al.* 2015).

Con respecto a la edad de los terneros en que fueron detectados los patotipos, nuestros resultados difieren ligeramente con lo reportado en la bibliografía. En general se indica que las infecciones producidas por AEEC estarían comprendidas entre los 20 a 30 días de vida (Radostits *et al.* 2007; Blanchard 2012) aunque en nuestro caso, observamos su ocurrencia en animales de mayor y menor edad lo que ratifica la complejidad en la epidemiología de esta enfermedad.

Las posibles explicaciones para la cantidad de aislamientos negativos para los genes evaluados son varias. La primera de ellas consiste en entender que *E. coli* es uno de los principales componentes de la microbiota nativa de terneros sanos y por tanto es esperable que cepas no patógenas se encuentren en un alto número en el ambiente intestinal. En segundo lugar, no se debe descartar la posibilidad de que la diarrea esté siendo causada por otros patotipos de *E. coli* diferentes de STEC, EHEC y EPEC. Estudios ampliados de factores de virulencias característicos de otros patotipos deberían realizarse para clasificar en profundidad estos aislamientos. Otra interpretación posible quizás pueda tener que ver con la gran diversidad que poseen los genes *eae* y *stx*. Si bien los cebadores empleados en el PCR intentan cubrir la mayor cantidad de variantes, es posible que en nuestro medio se encuentren circulando otras, y por lo tanto se observen resultados negativos lo que ya ha sido advertido por otros autores (Blanchard 2012).

No se debe perder de vista tampoco que en DNT se encuentran implicados otros patógenos como virus y protozoarios, por lo que no es sorprendente que animales clínicamente enfermos hayan arrojado resultado negativo para los patotipos de *E. coli* estudiados.

Por otra parte, con el fin de estudiar la estructura poblacional de los aislamientos de *E. coli* presentes en heces de bovinos jóvenes con DNT y bovinos sanos, se evaluó la diversidad filogenética mediante la técnica de MLST. Esta técnica permitió determinar que existe una gran heterogeneidad genética en la población de *E. coli*. De esta forma a la hora de relacionar los atributos de virulencia, región geográfica, estado del animal y año de recolección de las muestras se obtuvieron resultados dispares. En cierta medida hubiese sido esperable que existiese una concordancia en el agrupamiento de aquellos ST de una misma región, o estado sanitario del animal del cual provenían, pero en la mayoría de los casos esto no se observó. Además, se evidenciaron diferencias entre las características de los ST registrados en la base de datos y las de los obtenidos en este trabajo. Se encontraron ST previamente asociados a cepas patógenas de *E. coli* presentes en aislamientos provenientes de animales sin síntomas de DNT en nuestra colección y viceversa.

Vale hacer mención al caso particular de los aislamientos 59.1 y 64.2 que se agrupan dentro de un mismo ST (ST101). Ambos aislamientos provienen de un mismo establecimiento, pero difieren en el estado sanitario de los animales de los cuales fueron obtenidos. En el caso del aislamiento 59.1 se trató de un animal sano, mientras que el 64.2 se trató de una animal con síntomas de DNT grave. Cabe destacar que en nuestro laboratorio se han realizado estudios previos de resistencia a antibióticos sobre esta colección de cepas, siendo el aislamiento 64.2 multirresistente a antibióticos (Umpiérrez 2016). Las observaciones realizadas previamente sobre la baja correspondencia entre cercanía filogenética y estado sanitario del animal son consistentes con trabajos anteriormente realizados en nuestro Departamento mediante la técnica de *rep*-PCR (Umpiérrez *et al.* 2015).

Yendo más en profundidad en el análisis de las características de los ST encontrados, no se puede pasar por alto la ocurrencia del ST69. El mismo ha sido ampliamente caracterizado por su papel en infecciones extraintestinales (ExPEC), en particular en infecciones del tracto urinario en humanos (UPEC) (Tartof *et al.* 2005). Asimismo, existen reportes recientes de su detección en muestras de agua, lo que podría constituir un reservorio de este ST (Müller *et al.* 2016).

En cuanto a lo observado en el agrupamiento en complejos de ST (Tabla 9), encontramos el caso particular del ST21 perteneciente al complejo de ST29. Este complejo ha sido reportado en aislamientos de EHEC a nivel mundial de origen animal y humano, lo que inevitablemente conduce a reflexionar sobre el potencial zoonótico de dichos aislamientos.

A partir de los análisis filogenéticos fue posible observar aislamientos que, si bien corresponden a ST diferentes y provienen de huéspedes sintomáticos y asintomáticos, se agrupan juntos. Esto último trae nuevamente al plano de discusión lo compleja de la interacción hospedero-microorganismo; lo que hace pensar que factores externos como las condiciones de manejo, nutrición e infecciones por otros microorganismos juegan un papel preponderante en el desarrollo de la infección.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que los patotipos STEC, EPEC y EHEC no tendrían una amplia prevalencia en los rodeos afectados por DNT en Uruguay. De la misma forma tampoco se asociarían con el estado salud-enfermedad del animal del cual provienen, lo que asigna al estado de salud del hospedero un importante papel en el desarrollo de la enfermedad.

Al mismo tiempo estos resultados demuestran una elevada diversidad genética de este microorganismo asociado a DNT, evidenciada por la multiplicidad de ST distintos encontrados en un acotado número de aislamientos analizados.

Este trabajo, constituye un aporte al conocimiento de una problemática actual y de creciente relevancia en el contexto productivo del agro uruguayo, y pretende entre otras cosas promover el desarrollo de estudios futuros.

REFERENCIAS

Adu-Bobie J., Frankel G., Bain C., Goncalves A.G., Trabulsi L.R., Douce G., Krutton S., Dougan G. 1998. Detection of intimins alpha, beta, gamma, and delta, four intimina derivatives expressed by attaching and effacing microbial pathogens. *J. Clin. Microbiol.* 36: 662-668.

Angelos J.A. 2015. Infectious Bovine Keratoconjunctivitis (Pinkeye). *Vet. Clin. Food Anim.* 15: 0720-0749.

Bansal T., Englert D., Lee J., Hegde M., Wood T.K., Jayaraman A. 2007. Differential effects of epinephrine, norepinephrine, and indole on *Escherichia coli* O157:H7 chemotaxis, colonization, and gene expression. *Infect Immun.* 75: 4597-4607.

Bellizoni R.C.B., J., Terzola H.R., Moreira A.R., Auza N., Mattion N., Micheo G.L., La Torre J.L., Scodeller E.A. 1990, Microbiology of diarrhea in young beef and dairy calves in Argentina. *Rev. Arg. de Microb.* 22: 130-136.

Bergan J., Dyve Lingelem A.B., Simm R., Skotland T., Sandvig K. 2012. Shiga toxins. *Toxicon.* 60: 1085–1107.

Besser T.E., Richards B.L., Rice D.H. and Hancock D.D. 2001. *Escherichia coli* O157: H7 infections of calves: infectious dose and direct contact transmission. *Epidemiol. Infect.* 127:555-560.

Bilbao G.N., Chacana P.A., Parreño V. y Terzolo H.R. 2007. Diarrea de los terneros, una solución proporcionada por la gallina: <http://www.produccion-animal.com.ar>

Bilbao G.N., Pinto de Almeida Castro A.M., Badaracco A., Rodriguez D., Monteavaro C.E., Parreño V. 2012. Diarrea neonatal del ternero. Sitio argentino de producción animal: <http://www.produccion-animal.com.ar>

Blanchard P.C. 2012. Diagnostics of Dairy and Beef Cattle Diarrhea. *Vet. Clin. Food Anim.* 28: 443–464.

Blanco M., Padola N.L., Kruger A., Sanz M.E., Banco J.J.E., González E.A., Dahbi G., Mora A., Bernárdez M.I., Etchevería A.I., Arroyo G.H., Lucchesi P.M.A., Parma A.E. y Blanco J.J.E. 2004. Virulence genes and intimina types of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle and beef products in Argentina. *Int. Microbiol.* 7: 269-276.

Brady M.J., Radhakrishnan P., Liu H., Magoun L., Murphy K.C., Mukherjee J., Donohue-Rolfe A., Tzipori S., Leong J.M. 2011. Enhanced actin pedestal

formation by enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 adapted to the mammalian host. *Front. Microbiol.* 2: 1-10.

Campellone K.G., Leong J.M. 2003. Tails of two Tirs: actin pedestal formation by enteropathogenic *E. coli* an enterohemorrhagic *E. coli* O157:H7. *Curr. Opin. Microbiol.* 6: 82–90.

Campellone K.G., Rankin S., Pawson T., Kirschner M.W., Tipper D.J., Leong J.M. 2004. Clustering of Nck by a 12-residue Tir phosphopeptide is sufficient to trigger localized actin assembly. *J. Cell. Biol.* 164: 407-416.

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

Cleary J., Lai L.-C., Shaw R.K., Straatman-Iwanowska A., Donnenberg M.S., Frankel G. and Knutton S. 2004. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adhesion to intestinal epithelial cells: role of bundle-forming pili (BFP), EspA filaments and intimina. *Microb.* 150: 527-538.

Constable P.D. 2004. Antimicrobial use in the treatment of calf diarrhea. *J. Vet. Intern. Med.* 18: 8–17.

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

Davis T.K, van dr Kar N.C.A.J., Tarr P.I. 2014. Shiga toxin/verocytotoxin-producing *Escherichia coli* infections: practical clinical perspectives. *Microbiol. Spec.* 2: 1-16.

de Verdier K., Ohagen P., Alenius S., 2003. No effect of a homeopathic preparation on neonatal calf diarrhea in a randomized double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Acta. Vet. Scand.* 44: 97–101.

DeVinney R., Stein M., Reinscheid D., Abe A., Ruschkowski S. and Finaly B.B. 1999. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 produces Tir, which is translocated to the host cell membrane but is not tyrosine phosphorylated. *Infect. Immun.* 67: 2389-2398.

Dirksen G., Grunder H-D., Stober M. 2005. *Medicina interna y cirugía del bovino.* Vol. 1. 4ta Edición. Editorial Inter-Médica A.A.I.C.I. Buenos Aires, República Argentina.

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

Drumm B., Robertson A.M. and Sherman P.M. 1988. Inhibition of attachment of *Escherichia coli* RDEC-1 to intestinal microvillus membranes by rabbit ileal mucus and mucin *in vitro*. *Infect. Immun.* 56: 2437-2442.

Dziva F., van Diemen P.M., Stevens M.P., Smith A.J., Wallis T.S. 2004. Identification of *Escherichia coli* O157:H7 genes influencing colonization of the bovine gastrointestinal tract using signature-tagged mutagenesis. *Microbiol.* 151: 2773–278.

Ebel F., Podzadel T., Rohde M., Kresse A.U., Kramer S., Deibel C., Guzman C.A., Chakraborty T. 1998. Initial binding of Shiga toxin producing *Escherichia coli* to host cells and subsequent induction of actin rearrangements depend on filamentous EspA-containing surface appendages. *Mol. Microbiol.* 30: 147–161.

Elliott S.J., Wainwright L.A., McDaniel T.K., Jarvis K.G., Deng Y.K., Lai L.C., 1998. The complete sequence of the locus of enterocyte effacement (LEE) from the enteropathogenic *E. coli* E2348/69. *Mol. Microbiol.* 28: 1-4.

Endo Y., Tsurugi K., Yutsudo T., Takeda Y., Ogasawara T. and Igarashi K. 1988. Site of action of a Vero toxin (VT2) from *Escherichia coli* O157:H7 and of Shiga toxin on eukaryotic ribosomes. RNA N-glycosidase activity of the toxins. *Eur. J. Biochem.* 171: 45-50.

Enninga J. and Rosenshine I. 2009. Imaging the assembly structure, and activity of type III secretion systems. *Cell Microbiol.* 11: 1462–1170.

Feng P. 2014. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in fresh produce - a food safety dilemma. *Microbiol. Spec.* 2: 1-11.

Foley S.L., Lynne A.M., Nayak R. 2009. Molecular typing methodologies for microbial source tracking and epidemiological investigations of Gram-negative bacterial foodborne pathogens. *Infect. Genet. Evol.* 9: 430-440.

Foster D.M., Smith G.W. 2009. Pathophysiology of diarrhea in calves. *Vet. Clin. North Am Food Anim. Pract.* 25: 13–36.

Francis D.H., Erickson A.K. and Grange P.A. 1999. K88 adhesins of enterotoxigenic *Escherichia coli* and their porcine enterocyte receptors. *Adv. Exp. Med. Biol.* 473: 147-154.

Franck S.M., Bosworth B.T., Moon H.W., 1998. Multiplex PCR for enterotoxigenic, attaching and effacing, and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from calves. *J. Clin. Microbiol.* 36: 1795-1797.

Frankel G., Candy D.C., Everest P., Dougan G. 1994. Characterization of the C-terminal domains of intimin-like proteins of Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, and *Hafnia alvei*. *Infect. Immun.* 62: 1835–1842.

Grove-White D.H. 2004. A rational approach to treatment of calf diarrhea. *Ir. Vet. J.* 57: 722–728.

Guttman J.A., Li Y., Wickham M.E., Deng W., Vogl A.W. and Finaly B.B. 2006. Attaching and effacing pathogen-induced tight junction disruption in vivo. *Cell. Microbiol.* 8: 634-645.

Gyles C.L. and Fairbrother J.M. 2010. *Escherichia coli* In Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals. 4th edition. Ames I.A.: Wiley-Blackwell. pp. 267-308.

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.

Hazes B., and Read R.J. 1997. Accumulating evidence suggests that several AB-toxins subverts the endoplasmic reticulum-associated protein degradation pathway to enter target cells. *Biochem.* 36: 4-7.

Hughes D.T., Sperandio V. 2008. Inter-Kingdom signaling: communication between bacteria and their hosts. *Nat. Rev. Microbiol.* 6: 111–120.

Humphries R.M., Griener T.P., Vogt S.L., Mulvey G.L., Raivio T., Donnenberg M.S., Kitov P.I., Surette M. and Armstrong G.D. 2010. N-acetyllactosamine-induced retraction of bundle-forming pili regulates virulence-associated gene expression in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 76: 1111-1126.

Hussein H.S., Bollinger L.M. 2005. Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef cattle. *J. Food Prot.* 68: 2224-2241.

Hussein H.S., Sakuma T. 2005. Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in dairy cattle and their products. *J. Dairy Sci.* 88: 450-465.

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

Kahn C.M. (Ed). 2007. Manual Merck de Veterinaria. 6ta edición. Editorial Océano. Barcelona, España.

Kaper J.B., Nataro J.P., Mobley H.L. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* 2: 123-140.

Karmali M.A. 1989. Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. Clin Microbiol. Rev. 2: 5–28.

Kawano K., Okada M., Haga T., Maeda K., Goto Y. 2008. Relationship between pathogenicity for humans and *stx* genotype in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotype O157. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 27: 227–232.

Kendall M.M., Gruber C.C., Parker C.T., 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.

Kenny B., DeVinney R., Stein M., Reinscheid D., Frey E. and Finaly B. 1997. Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. Cell 91: 511-520.

Khursigara C., Abul-Milh M., Lau B., Giro´n J.A., Lingwood C.A., and Barnett foster D.E. 2001. Enteropathogenic *Escherichia coli* Virulence Factor Bundle-Forming Pilus Has a Binding Specificity for Phosphatidylethanolamine. Infect. Immun., 69: 6573–6579.

Kim J.C., Yoon J.W., Kim C.H., Park M.S., Cho S.H. 2012. Repression of flagella motility in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 by mucin components. Biochem. Biophys. Res. Commun. 423: 789–792.

Knutton S., Rosenshine I., Pallen M.J., Nisan I., Neves B.C., Bain C., Wolff C., Dougan G., Frankel G. 1998. A novel EspA-associated surface organelle of enteropathogenic *Escherichia coli* involved in protein translocation into epithelial cells. EMBO J. 17: 2166–2176.

Kolenda R., Burdukiewicz M. and Schierack P. 2015. A systematic review and meta-analysis of the epidemiology of pathogenic *Escherichia coli* of calves and the role of calves as reservoirs for human pathogenic *E.coli*. Front. Cell. Infect. Microbiol. 5: 1-12.

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

Kuhnert P., Dubosson C.R., Roesch M., Homfeld E., Doherr M.G., Blum J.W. 2005, Prevalence and risk-factor analysis of Shiga toxigenic *Escherichia coli* in faecal samples of organically and conventionally farmed dairy cattle. Vet. Microbiol. 109: 37-45.

Larson M.A., Wei S.H., Weber A., Mack D.R. and McDonald T.L. 2003. Human serum amyloid A3 peptide enhance intestinal MUC3 expression and inhibits EPEC adherence. Biochem. Biophys. Res. Comm. 300: 531-540.

Lee S.-Y., Lee M.-S., Cherla R.P., and Tesh V.L. 2008. Shiga toxin 1 induces apoptosis through the endoplasmic reticulum stress response in human monocytic cells. *Cell. Microbiol.* 10: 770-780.

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

Lindén S.K., Florin T.H.J. and McGuckin M.A. 2008. Mucin dynamics in intestinal bacterial infection. *P. One* 3: 1-14.

Ling H., Boodhoo A., Hazes B., Cummings M.D., Armstrong G.D., Brunton J.L., Read R.J. 1998. Structure of the Shiga-like toxin I B-pentamer complexed with an analogue of its receptor Gb3. *Biochem.* 37: 1777–1788.

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

Lorenz I., Fagan J., More S.J., 2011. Calf health from birth to weaning II. Management of diarrhoea in pre-weaned calves. *Ir. Vet. J.* 64: 69.

Mack D.R., Michail S., Wei S., McDougall L. and Hollingsworth M.A. 1999. Probiotics inhibit Enteropathogenic *E. coli* adherence in vitro by inducing intestinal mucin gene expression. *Am. J. Physiol.* 276: G941-G950.

Mahajan A., Currie C.G., Mackie S., Tree J., McAteer S., McKendrick I., McNeilly T.N., Roe A., La Ragione R.M., Woodward M.J., Gally D.L., Smith D.G. 2009. An investigation of the expression and adhesion function of H7 flagella in the interaction of *Escherichia coli* O157:H7 with bovine intestinal epithelium. *Cell Microbiol.* 11: 121–137.

Maiden M.C., Bygraves J.A., Feil E., Morelli G., Russell J.E., Urwin R., Zhang Q., Zhou J., Zurth K., Caugant D.A., Feavers I.M., Achtman M., Spratt B.G. 1998. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 3140-3145.

Mainil J. 2013. *Escherichia coli* virulence factors. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 152: 2-12.

Malak A. E., Issmat I., Kassem Von, S. 2008. Optimization of DGGE community fingerprinting for characterizing *Escherichia coli* communities associated with fecal pollution. *W. Re.* 42: 4467–4476.

Margueritte J.M., Blackhall J., Fernández F., Parreño V., Vangonzzi, A., Odeón A. y Combessies G. 2005. Diarrea neonatal en terneros de rodeos de cría: su prevención y tratamiento: <http://www.produccion-animal.com.ar>

- McDaniel T.K., Jarvis K.G., Donnenberg M. S. and Kaper J. K.** 1995. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92: 1664-1668.
- McDaniel T.K. and Kaper J.B.** 1997. A cloned pathogenicity island from Enteropathogenic *Escherichia coli* confers the attaching and effacing phenotype on *E. coli* K-12. *Mol. Microbiol.* 23: 399-407.
- McGucking M.A.M., Lindén S.K.S., Sutton P.P. and Florin T.H.T.** 2011. Mucin dynamics and enteric pathogens. *Nat. Rev. Micro.* 9: 265-278.
- Mellies J.L., Lorenzen E.** 2014. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* virulence gene regulation. *Microbiol. Spec.* 2: 1-15.
- Melton-Celsa A.R.** 2014. Shiga toxin (Stx) classification, structure, and function. *Microbiol Spectrum* 2: 1-21.
- Moon H.W., Whipp S.C., Argenzio R.A., Levine M.M. and Gianella R.A.** 1983. Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines. *Infect. Immun.* 41: 1340-1351.
- Morabito S.** 2014. Pathogenic *Escherichia coli*. *Molecular and Cellular Microbiology*. Caister Academic Press. Norfolk, UK. pp 79-101.
- Moxley R.A., Smith D.R.** 2010. Attaching-effacing *Escherichia coli* Infections in Cattle. *Vet. Clin. Food. Anim.* 26: 29–56
- Müller D., Greune L., Heusipp G., Karch H., Fruth A., Tschape H., Schmidt M.A.,** 2007. Identification of unconventional intestinal pathogenic *Escherichia coli* isolates expressing intermediate virulence factor profiles by using a novel single-step multiplex PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 3380-3390.
- Müller C.A., Broz P. and Cornelis G.R.** 2008. The type III secretion system tip complex and translocon. *Mol. Microbiol.* 68: 1085–1095.
- Müller D., Benz I., Liebchen A., Gallitz I., Karch H., and Schmidt, M.A.** 2009. Comparative analysis of the locus of enterocyte effacement and its flanking regions. *Infect. Immun.* 77: 3501–3513.
- Müller A., Stephan R., Nüesch-Inderbinen M.** 2016. Distribution of virulence factors in ESBL-producing *Escherichia coli* isolated from the environment, livestock, food and humans. *Sci. of the T. Env.* 541: 667–672.

- Murray G.M., O'Neill R.G., More S.J., McElroy M.C., Earley B., Cassidy J.P.** 2016. Evolving views on bovine respiratory disease: An appraisal of selected key pathogens – Part 1. *The Vet. J.* 217: 95–102.
- Nagy B., Casey T.A., Whipp S.C. and Moon H.W.** 1992. Susceptibility of porcine intestine to pilus-mediated adhesion by some isolates of piliated enterotoxigenic *Escherichia coli* increases with age. *Infect. Immun.* 60: 1285-1294.
- Nagy B., Fekete P.Z.** 1999. Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in farm animals. *Vet. Res.* 30: 259-284.
- Nakanishi N., Tashiro K., Kuhara S., Hayashi T., Sugimoto N., Tobe T.** 2009. Regulation of virulence by butyrate sensing in Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Microbiol.* 155: 521–530.
- Nataro J.P., Kaper J.B.** 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 11: 142–201.
- Naylor S.W., Low J.C., Besser T.E., Mahajan A., Gunn G.J., Pearce M.C., McKendrick I.J., Smith D.G., Gally D.L.** 2003. Lymphoid follicle-dense mucosa at the terminal rectum is the principal site of colonization of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 H7 in the bovine host. *Infect Immun* 71: 1505-1512.
- Naylor S.W., Roe A.J., Nart P., Spears K., Smith D.G., Low J.C. and Gally DL.** 2005. *Escherichia coli* O157:H7 forms attaching and effacing lesions at the terminal rectum of cattle and colonization requires the LEE 4 operon. *Microbiol.* 151: 2773–2781.
- Neely M.N. and Friedman D.I.** 1998. Functional and genetic analysis of regulatory regions of coliphage H-19B: location of shiga-like toxin and lysis genes suggest a role for phage functions in toxin release. *Mol. Microbiol.* 28: 1255-1267.
- Neill M.A.** 1997. Overview of verotoxigenic *Escherichia coli*. *J. Food Prot.* 60: 1444-1446.
- Nguyen T.D., Vo T.T., Vu-Khac H.** 2010. Virulence factors in *Escherichia coli* isolated from calves with diarrhea in Vietnam. *J. Vet. Sci.* 12: 159-164.
- Nguyen Y, Sperandio V.** 2012. Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) pathogenesis. *Front. cell Infect. Microbiol.* 2: 90.
- Nielsen E.M., Tegtmeyer C., Andersen H.J., Gronbaek C., Andersen J.S.** 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 A.D., LaVeck G.D., Thompson M.R., Formal S.B. 1982. Production of *Shigella dysenteriae* type 1-like cytotoxin by *Escherichia coli*. J. Infect. Dis. 146: 763–769.

Obata F., Obrig T. 2014. Role of Shiga/Vero toxins in pathogenesis. Microbiol Spectrum 2: 1-26.

Odeón A.C. 2001. Diarrea Neonatal de los terneros: Etiopatogenia, tratamiento y control: <http://www.produccion-animal.com.ar>

Ok M., Guler L., Turgut K., Ok U., Sen I., Gunduz I.K., Birdane M.F., Guzelbektes H. 2009. The studies on the aetiology of diarrhoea in neonatal calves and determination of virulence gene markers of *Escherichia coli* strains by multiplex PCR. Z. Pub. H. 56: 94-101.

Pallen M.J., Beatson S.A., Bailey C.M. 2005. Bioinformatics analysis of the locus for enterocyte effacement provides novel insights into type-III secretion. BMC Microbiol. 5: 9.

Paton J.C. and Paton A.W. 1998. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. Clin. Microbiol. Rev. 11: 450-479.

Pérez-Losada M., Cabezas P., Castro-Nallar E., Crandall K.A. 2013. Pathogen typing in the genomics era: MLST and the future of molecular epidemiology. Infect. Gen. and Evol. 16: 38–53.

Price S.B., Wright J.C., DeGraves F.J., Castanie-Cornet M.P., Foster J.W. 2004. Acid resistance systems required for survival of *Escherichia coli* O157:H7 in the bovine gastrointestinal tract and in apple cider are different. Appl. Environ. Microbiol. 70: 4792–4799.

Pruimboon-Brees I.M., Morgan T.W., Ackermann M.R., Nystrom E.D., Samuel J.E., Cornick N.A., Moon H.W. 2000 Cattle lack vascular receptors for *Escherichia coli* O157 H7 Shiga toxins. Proc. Natl. Acad. Sci. 97: 10325-10329.

Radostits O., Gay C.C., Hinchcliff K. and Constable P.D. 2007. Diseases associated with *Escherichia coli*. In Veterinary medicine – A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats. 10th edition. Saunders Elsevier, Philadelphia P.A. pp. 847-896.

Rasko D.A., Rosovits M.J., Myers G.S.A., Mongodin E.F., Fricke W.F., Gajer P. 2008. The pangenome structure of *Escherichia coli*: comparative genomic analysis of *E. coli* commensal and pathogenic isolates. J. Bacteriol. 190: 6881-6893.

- Rollin R.E., Mero K.N., Kozisek P.B.** 1986. Diarrhea and malabsorption in calves associated with therapeutic doses of antibiotics: absorptive and clinical changes. *Am. J. Vet. Res.* 47: 987–91.
- Runnels P.L., Moon H.W., Schneider R.A.** 1980. Development of resistance with host age to adhesion of K99 *Escherichia coli* to isolated intestinal epithelial cells. *Infect. Immun.* 28: 298–300.
- Salvador M.R.V., Leite D.S., Blanco J., Yano, T.** 2003. Virulence factors of *Escherichia coli* isolated from calves with diarrhea in Brazil. *Brazil J. of Microbiol.* 34: 230-235.
- Sandvig K., Olsnes S., Brown J.E., Petersen O.W., van Deurs B.** 1989. Endocytosis from coated pits of Shiga toxin: a glycolipid-binding protein from *Shigella dysenteriae*1. *J. Cell. Biol.* 108: 1331-1343.
- Sandvig K., Ryd M., Gerred O., Schweda E., Holm P.K., van Deurs B.** 1994. Retrograde transport from de Golgi complex to the ER of both Shiga toxin and the nontoxic Shiga B-fragment is regulated by butyric acid and cAMP. *J. Cell Biol.* 126: 53-64.
- Scheutz F., Teel L.D., Beutin L., Pierard D., Buvens G., Karch H., Mellmann A., Caprioli A., Tozzoli R., Morabito S., Strockbine N.A., Melton-Celsa A.R., Sanchez M., Persson S., O'Brien A.D.** 2012. Multicenter evolution of a sequence-based protocol for subtyping shiga toxins and standardizing Stx nomenclature. *J. Clin. Microbiol.* 50: 2951–2963.
- Schmidt M.A.** 2010. LEEways: tales of EPEC, ATEC and EHEC. *Cell Microbiol.* 12: 1544-1552.
- Shimizu T., Ohta Y., and Noda M.** 2009. Shiga toxin 2 is specifically released from bacterial cells by two different mechanisms. *Infect. Immun.* 77: 2813-2823.
- Shull J.J., Frederick H.M.** 1978. Adverse effect of oral antibacterial prophylaxis and therapy on incidence of neonatal calf diarrhea. *Vet. Med. Small Anim. Clin.* 73: 24–30.
- Singh P., Sha Q., Lacher D.W., Del Valle J., Mosci R.E., Moore J.A., Scribner K.T., Manning S.D.** 2015. Characterization of enteropathogenic and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in cattle and deer in a shared agroecosystem. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 5: 1-13.
- Smith C.J., Kaper J.B. and Mack D.R.** 1995. Intestinal mucin inhibits adhesion of human Enteropathogenic *Escherichia coli* to HEP-2 cells. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 21: 269-276.

- Smith G.** 2015. Antimicrobial Decision Making for Enteric Diseases of Cattle. *Vet. Clin. Food. Anim.* 31: 47–60
- Sperandio V., Torres A.G., Jarvis B., Nataro J.P., Kaper J.B.** 2003. Bacteria-host communication: the language of hormones. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100: 8951–8956.
- Stevens M.P., Frankel G.M.** 2014. The Locus of enterocyte effacement and associated virulence factors of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Microbiol. Spect.* 2: 1-25.
- Suh J.K., Hovde C.J., and Robertus J.D.** 1998. Shiga toxin attacks bacterial ribosomes as effectively as eukaryotic ribosomes. *Biochem.* 37: 9394-9398.
- Tartof S.Y., Solberg O.D., Manges A.R., Riley L.W.** 2005. Analysis of a uropathogenic *Escherichia coli* clonal group by Multilocus Sequence Typing. *J. of Clin. Microbiol.* 43: 5860–5864.
- Tenaillon O., Skurnik D., Picard B., and Denamur E.** 2010. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* 8: 207-217.
- Tenenberg S., Willensen P.T.J., de Graaf F.K. and Karlsson K.A.** 1990. Receptor-active glycolipids of epithelial cells of the small intestine of young and adult pigs in relation to susceptibility to infection with *Escherichia coli* K99. *FEBS Lett.* 263: 10-14.
- Timm C.D., Irino K., Gomes T.A., Vieira M.M., Guth B.E., Vaz T.M., Moreira C.N., Aleixo J.A.** 2007. Virulence markers and serotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, isolated from cattle in Rio Grande do Sul, Brazil. *L. in App. Microbiol.* 44: 419-425.
- Tobe T., Beatson S.A., Taniguchi H., Abe H., Bailey C.M., Fibian A., Younis R., Matthews S., Marches O., Frankel G., Hayashi T., Pallen M.J.** 2006. An extensive repertoire of type III secretion effectors in *Escherichia coli* O157:H7 and the role of lambdoid phages in their dissemination. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103: 14941–14946.
- Tobe T., Nakanishi N., Sugimoto N.** 2011. Activation of motility by sensing short-chain fatty acids via two steps in a flagellar gene regulatory cascade in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 79: 1016–1024.
- Tyler J.S., Mills M.J., Friedman D.I.** 2004. The operator and early promoter region of the Shiga toxin type 2-encoding bacteriophage 933W and control of toxin expression. *J Bacteriol.* 186: 7670–7679.
- Umpiérrez A., Acquistapace S., Oliver M., Fernández S., Zunino P.** 2015. Caracterización de *Escherichia coli* asociada a la Diarrea Neonatal de Terneros en Uruguay. Congreso anual de la Sociedad Uruguaya de Microbiología. Montevideo, Uruguay.

Umpiérrez A. 2016. Identificación y caracterización de *Escherichia coli* asociada a la diarrea neonatal de terneros en Uruguay. Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas, opción Microbiología. UdelaR, PEDECIBA-Biología pp. 75-83.

Uyeno Y., Shigemori S. and Shimosato T. 2015. Effect of Probiotics/Prebiotics on Cattle Health and productivity. *Microb. Environ.* 30: 126-132.

Wirth T., Falush D., Lan R., Colles F., Mensa, P., Wieler L.H., Karch H., Reeves P.R., Maiden M.C., Ochman H., and Achtman M. 2006. Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. *Mol.Microbiol.* 60: 1136-1151.

Wu X.Y., Chapman T., Trott D.J., Bettelheim K., Do T.N., Driesen S., Walker N.J., Chin J., 2007. Comparative analysis of virulence genes, genetic diversity and phylogeny of commensal and Enterotoxigenic *Escherichia coli* isolates from weaned pigs. *App. Env. Microb.* 73: 83–91.

Zhang X., McDaniel A.D., Wolf L.E., Keusch G.T., Waldor M.K., Acheson D.W. 2000. Quinolone antibiotics induce Shiga toxin-encoding bacteriophages, toxin production, and death in mice. *J. Infect. Dis.* 181: 664–670.