

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

Asignación de grupos filogenéticos a cepas de *Escherichia coli* productoras de Toxina Shiga LEE-positivas, asociadas a diarrea neonatal de terneros

Bach. Andrea Cardozo

Tutora: Dra. Ana Umpiérrez

Co-Tutora: Dra. Inés Bado

Evaluadores externos:

Dra. Fernanda Azpiroz

Dr. Gustavo Varela

Departamento de Microbiología
Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable

2020

ÍNDICE

Abreviaturas	3
Agradecimientos	4
Resumen	5
1. Introducción	6
1.1 Enfermedades infectocontagiosas en el ganado	6
1.2 <i>Escherichia coli</i>	7
1.2.1 <i>E. coli</i> enterotoxigénica	8
1.2.2 <i>E. coli</i> enteropatógena	9
1.2.3 <i>E. coli</i> necrotoxigénica y <i>E. coli</i> de adherencia difusa	9
1.2.4 <i>E. coli</i> productora de toxina Shiga	10
1.2.5 Clasificación de las toxinas Shiga	10
1.2.6 Ingreso al organismo y mecanismo de acción de las toxinas Shiga	11
1.2.7 STEC LEE-positivas y STEC LEE-negativas	12
1.3 Colitis Hemorrágica y Síndrome Urémico Hemolítico	12
1.4 Serogrupos y brotes por STEC	13
1.5 Grupos filogenéticos de <i>Escherichia coli</i>	14
1.6 Resistencia a los antibióticos - emergencia sanitaria	16
1.7 Mecanismos de resistencia	19
1.7.1 β -lactámicos	20
1.7.2 Quinolonas	21
1.7.3 Aminoglucósidos	22
1.8 Antecedentes en Uruguay	22
2. Objetivo general	24
2.1 Objetivos específicos	24
3. Estrategia experimental	25
3.1 Aislamientos de <i>E. coli</i> de origen bovino	25
3.2 Extracción de ADN	25
3.3 PCR cuádruple	27
3.4 Asignación de grupos filogenéticos	29
3.5 Estudios de susceptibilidad	29
3.6 Búsqueda de genes de resistencia transferible a fluoroquinolonas y fosfomicina	29
4. Resultados	32
4.1 PCR cuádruple	32
4.2 Asignación de grupo filogenético	33
4.3 Resistencia a antibióticos	36
4.3.1 Estudios de susceptibilidad antibiótica	36
4.3.2 Búsqueda de mecanismos de resistencia a fluoroquinolonas y fosfomicina	38
4.3.3 Confirmación de la identidad del gen <i>fosA7</i>	39
5. Discusión	40
6. Perspectivas	44
7. Bibliografía	45

Abreviaturas

A/E: *attachment and effacement*
AK: amikacina
AMP: ampicilina
APEC: *Escherichia coli* patógena de aves
ARNt: Ácido Ribonucleico de Transferencia
BLEA: β-lactamasas de espectro ampliado
CH: Colitis Hemorrágica
CIP: ciprofloxacina
CN: gentamicina
CNFs: *cytotoxic necrotizing factors*
CXM: cefuroxime
DAEC: *Escherichia coli* de adherencia difusa
DEC: *Escherichia coli* diarreogénicas
DNT: Diarrea Neonatal en Terneros
Eae: intimina
EAEC: *Escherichia coli* enteroagregativa
EIEC: *Escherichia coli* enteroinvasiva
EHEC: *Escherichia coli* enterohemorrágica
ENR: enrofloxacin
EPEC: *Escherichia coli* enteropatogénica
ETEC: *Escherichia coli* enterotoxigénica
EUCAST: *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*
ExPEC: *Escherichia coli* patógenas extraintestinales
FAO: Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
FOT: fosfomicina
Gb3: globotriaosylceramida 3
ITU: infecciones del tracto urinario
LEE: *Locus of enterocyte effacement*
NA: ácido nalidíxico
NMEC: *Escherichia coli* asociada a sepsis y meningitis
NTEC: *Escherichia coli* necrotoxigénica
OIE: Organización Mundial de Sanidad Animal
OMS: Organización Mundial de la Salud
PCR: Polymerase Chain Reaction
QRDR: región determinante de resistencia a quinolonas
SST3: Sistema de Secreción Tipo 3
STEC: *Escherichia coli* productora de Toxina Shiga
Stx: Toxina Shiga
SUH: Síndrome Urémico Hemolítico
SXT: trimetoprim-sulfametoxazol
TSA: Agar Soya Tripticasa
UPEC: *Escherichia coli* uropatogénica

Agradecimientos

A mis tutoras Ana Umpiérrez e Inés Bado por darme la oportunidad de realizar este trabajo y por todo lo que aprendí en el proceso.

A Pablo Zunino y a Rafael Vignoli por abrirme las puertas del Departamento de Microbiología del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable y del Departamento de Bacteriología y Virología del Instituto de Higiene, donde se realizaron los ensayos de filogrupos de *E. coli* y de resistencia a antibióticos respectivamente.

La mayoría de los aislamientos de STEC utilizados en este trabajo fueron colectados de heces de terneros de lechería por veterinarios, investigadores y técnicos de INIA-La Estanzuela, en el marco del proyecto *Estimación de la morbilidad y mortalidad de las enfermedades que afectan la cría de los terneros* desarrollado por dicha institución en colaboración con el Departamento de Microbiología del IIBCE (2015-2017). En representación de todo el grupo de trabajo, agradezco a todos ellos por su invaluable trabajo, sin el cual no contaríamos con la colección de STEC. En especial, agradecemos a la Dra. en Vet. M^a Laura Casaux, al Dr. en Vet. Darío Caffarena, al Dr. en Vet. Carlos Schild, al Dr. Martín Fraga, al Dr. Federico Giannitti y la técnica preparadora Cecilia Monesiglio.

A todos los integrantes del Departamento de Microbiología del IIBCE por darme una mano cuando lo necesité.

A Laura, Karina y mis compañeros de Beltrán Zunino por acompañarme en esta etapa. Un agradecimiento especial a Natalia por su insistencia y apoyo.

A las tres grandes amigas que me regaló la Facultad de Ciencias, por todo lo compartido. Nunca voy a encontrar las palabras para agradecerles el apoyo que me dieron estos años.

A mi familia por su amor.

A mis amigos por estar siempre.

Dedicado a mis padres que me dieron lo mejor siempre y me enseñaron que yo puedo ser quien quiera ser, a mis hermanas que me enseñaron lo que es el amor incondicional y a Yona mi amor y compañero de vida que me acompañó y sostuvo todo este tiempo.

RESUMEN

Escherichia coli forma parte de la microbiota del intestino de los humanos saludables, así como de otros mamíferos y aves, pero en ciertas circunstancias, cuando se rompe la barrera gastrointestinal, es capaz de causar infección. Además, existen clones de *E. coli* que han adquirido atributos de virulencia específicos que le permiten causar un amplio espectro de enfermedades, entre las que se incluyen enfermedad diarreica entérica y enfermedad extraintestinal (infecciones urinarias, meningitis, sepsis). Dentro del grupo de las *E. coli* diarreogénicas, las cepas de *E. coli* productoras de toxina Shiga (STEC) son altamente patógenas para los seres humanos, siendo los bovinos y otros rumiantes su principal reservorio.

La DNT es una de las dos enfermedades infectocontagiosas más frecuentes a nivel mundial en terneros, y *E. coli* enterotoxigénica es uno de los 5 agentes infecciosos más comúnmente asociado a la enfermedad en los primeros 5 días de vida de los terneros. Además, otros patotipos como *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* necrotoxigénica (NTEC) y STEC pueden también causar enfermedad en los bovinos.

La estructura poblacional de *E. coli* es mayormente clonal, reconociéndose actualmente 8 grupos filogenéticos (A, B1, B2, C, D, E, F y clado I). La determinación de dichos filogrupos se ha propuesto como una herramienta simple para asociar las cepas de *E. coli* a su fuente de origen. Con la finalidad de determinar los grupos filogenéticos de una colección de aislamientos de STEC, aisladas de heces de terneros, en este trabajo se puso a punto la técnica de PCR cuádruple a tiempo final, para la amplificación de los genes *chuA*, *yjaA*, *tspE4.C2* y *arpA* de *E. coli*. El grupo B1 fue el más representado de la colección con 9 aislamientos, 6 aislamientos de STEC se asignaron al grupo E, 2 fueron asignados al grupo A, 2 al grupo C y 1 al grupo F.

El uso indiscriminado de antibióticos, la automedicación y los tratamientos inadecuados e inconclusos son algunas de las razones que han llevado a que la resistencia a los antimicrobianos haya alcanzado niveles críticos a nivel mundial, lo que ha acarreado importantes problemas de salud, así como grandes pérdidas económicas en la clínica humana y en el sector productivo. En este trabajo se estudió la susceptibilidad a antibióticos de los aislamientos de STEC, y en aquellos aislamientos que presentaron resistencia a fluoroquinolonas y fosfomicina, se les realizó la búsqueda de genes responsables de conferir estas resistencias mediante PCR. Los mayores niveles de resistencia y susceptibilidad intermedia se observaron para ampicilina (80%) seguido de cefuroxime (60%). Un aislamiento presentó resistencia intermedia a las tres quinolonas estudiadas. Además, 1 aislamiento fue resistente a gentamicina y 2 aislamientos a fosfomicina. De los dos aislamientos analizados para el gen *fosA7* solo uno de ellos resultó positivo.

A partir de los resultados obtenidos, podemos afirmar que los aislamientos de STEC obtenidos de heces de terneros asociados a DNT pertenecen a diferentes grupos filogenéticos. Por otro lado, si bien se detectaron patrones de resistencia a algunos antibióticos y genes de resistencia transferibles (*fosA7*), solo uno de los aislamientos analizados presentó un perfil de multiresistencia.

1. Introducción

1.1 Enfermedades infectocontagiosas en el ganado

En Uruguay la producción pecuaria tradicionalmente ha sido de tipo extensiva, pero recientemente la intención por parte de los productores de mejorar la eficiencia ha llevado a que se tienda a la intensificación. Los sistemas intensivos pueden mejorar la eficiencia productiva complementando las situaciones deficitarias en diferentes zonas y épocas del año. Sin embargo, el estrés y la elevada concentración de animales pueden favorecer la difusión de enfermedades infectocontagiosas más rápidamente que en sistemas extensivos tradicionales (Odeón et al, 2001). En nuestro país, desde hace ya unos años existe una tendencia a la intensificación de los sistemas, con la finalidad de mejorar la eficiencia y con ello la rentabilidad. Además, el sistema ganadero ha sufrido una disminución del área destinada a la cría de ganado y a la lechería, principalmente debido a un importante incremento de las áreas destinadas a la forestación y a la agricultura del secano. Acompañando este escenario, la cría de rumiantes en nuestro país se encuentra desafiada por el incremento de la demanda de consumo, la necesidad de agregar valor a la producción y la exigencia de un marco normativo internacional orientado a la producción saludable (Anuario de la Dirección de Estadísticas Agropecuarias DIEA, 2019).

Además del estrés generado por las condiciones de hacinamiento y la higiene en los establecimientos ganaderos, uno de los principales factores determinantes para la ocurrencia de enfermedades infectocontagiosas es el consumo de calostro en las primeras horas de vida de los terneros (Lorenz et al, 2011). La ausencia en el consumo de este impide la correcta transmisión de anticuerpos de forma pasiva, lo que se ha visto que condiciona el desarrollo del neonato, su falta de vigor y el desarrollo de acidosis, pero, sobre todo, aumenta la ocurrencia de enfermedades bacterianas y virales, entre otras (Radosttis, 2007).

Entre las enfermedades más comúnmente detectadas en los bovinos se encuentran la queratoconjuntivitis infecciosa bovina, la clostridiosis, la neumonía y la diarrea neonatal, siendo las 2 últimas las más frecuentes a nivel mundial en terneros (Lorenz et al, 2011; Angelos, 2015; Kolenda et al, 2015; Murray et al, 2016). En particular, la Diarrea Neonatal en Terneros (DNT) es una enfermedad que presenta una etiología compleja, donde varios agentes infecciosos pueden estar asociados a los brotes, tanto individualmente como en combinación. Los rotavirus, coronavirus, *Escherichia coli*, *Cryptosporidium parvum* y *Clostridium perfringens* suelen ser los cinco agentes infecciosos más comúnmente asociados a la DNT (Kirisawa et al, 2007; Foster y Smith 2009). En este sentido, la prevalencia de cada patógeno y la incidencia de la enfermedad pueden variar entre las regiones geográficas donde se encuentran los rodeos. Trabajos recientes demuestran que *Cryptosporidium* spp., rotavirus, coronavirus y *E. coli* patógenas de animales y de humanos son detectados en casos de DNT en Uruguay, presentando sólo los tres primeros una asociación

estadísticamente significativa con los síntomas de la enfermedad (Umpiérrez et al, 2016; 2017; 2020; Caffarena, 2017).

1.2 *Escherichia coli*

Escherichia coli pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* y comparte las características de la familia, como ser, bacilo Gram negativo, oxidasa-negativo, fermentador de la glucosa y no exigente desde el punto de vista nutricional. Además, es anaerobio facultativo, puede ser móvil o no móvil y puede presentar flagelos peritricos (Croxen et al, 2013). Además, *E. coli* forma parte de la microbiota del intestino de los humanos saludables, así como de otros mamíferos y aves (Russo et al, 2000). Si bien normalmente se encuentra en el lumen intestinal sin causar daño, si el huésped se encuentra inmunodeprimido o debilitado, o si son violadas las barreras gastrointestinales, incluso una cepa de *E. coli* no patógena es capaz de causar enfermedad (Gyles et al, 2010).

Existen un gran número de clones de *E. coli* que han adquirido atributos de virulencia específicos denominados patotipos. Esto les permite causar un amplio espectro de enfermedades, entre las que se incluyen enfermedad diarreica entérica (*E. coli* diarreogénicas), infecciones del tracto urinario (ITU) y sepsis/meningitis (Kaper y O'Brien, 2014). En la mayoría de las enfermedades, la patogenidad está asociada a genes de virulencia ubicados en plásmidos (genes codificantes de enterotoxinas y fimbrias), bacteriófagos (genes de las toxinas Shiga) e islas de patogenicidad (genes de adhesión y borrado) (Gyles et al, 2010). Esto le confiere una gran plasticidad genómica y una gran capacidad de adaptarse a nuevos nichos (Fig. 1).

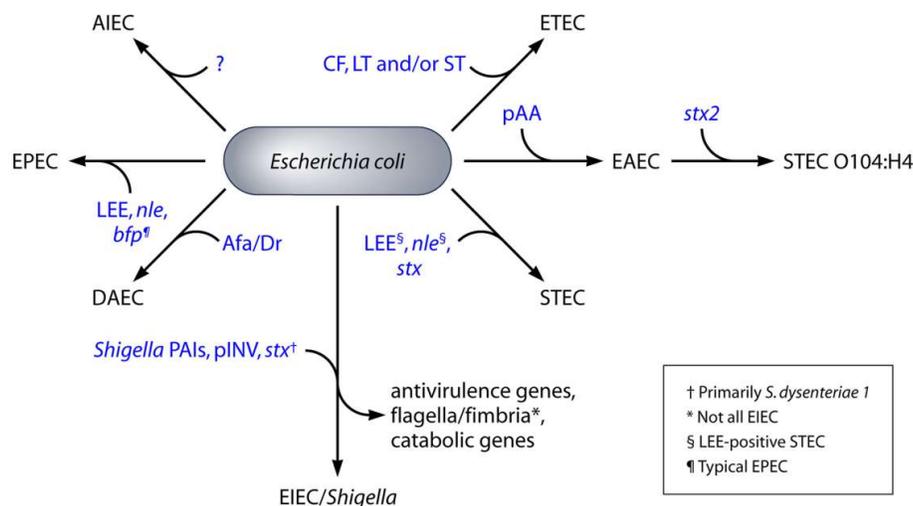


Figura 1. Vista general de la adquisición y pérdida de genes para diferentes patotipos de *Escherichia coli*. Tomada de Croxen et al, 2013.

Dentro del grupo de *E. coli* diarreogénicas (DEC) se encuentran distintos patotipos de *E. coli*: *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* productora de toxina Shiga/enterohemorrágica (STEC-LEE positiva), *E. coli* productora de toxina Shiga (STEC-LEE negativa), *E. coli* enteropatogénica (EPEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) y *E. coli* de adherencia difusa (DAEC). Por otro lado, se designan como *E. coli* patógenas extraintestinales (ExPEC) a las cepas que causan un amplio rango de infecciones extraintestinales, tales como *E. coli* uropatogénica (UPEC), *E. coli* necrotoxigénica (NTEC), *E. coli* patógena de aves (APEC) y *E. coli* asociada a sepsis y meningitis (NMEC) (Nataro y Kaper, 1998). Las cepas ExPEC no se caracterizan por la presencia de un factor de virulencia particular, pero normalmente tienen un gran número de factores de virulencia que pueden variar entre las diferentes cepas. Estos incluyen factores que contribuyen a la colonización bacteriana, resistencia a los efectos bactericidas del complemento y la fagocitosis, y actividad tóxica (Gyles et al, 2010) (Fig. 1).

A continuación, se describen brevemente los distintos patotipos de *E. coli* principalmente asociados a enfermedad diarreica en animales.

1.2.1 *Escherichia coli* enterotoxigénica

ETEC es uno de los patotipos más importante como agente primario de diarrea, que afecta principalmente la vida de los terneros en su primera semana de vida (Nagy y Fekete 1999; 2005). La infección por ETEC se caracteriza por una diarrea acuosa, deshidratación progresiva, acidosis, pérdida de elasticidad de la piel, hundimiento de los ojos, debilidad, hipotermia y coma, llevando en casos muy severos a la muerte de los animales (Foster y Smith, 2009; Gyles y Fairbrother, 2010). La vía de transmisión es en general la fecal-oral, debido a la contaminación ambiental y el hacinamiento de los animales de los establos (Foster et al, 2009). Este grupo además puede provocar diarrea en humanos, tanto en niños como en adultos (Nataro y Kaper, 1998).

Las cepas de ETEC se caracterizan por la producción de enterotoxinas y adhesinas que se adhieren al epitelio intestinal y promueven su colonización. Las enterotoxinas producidas por ETEC pueden ser termoestables (STa, STb, o enterotoxina termoestable de EAEC EST1) o termolábiles (LTI y LTII a, b y c) (Joffré et al, 2016; Nawar et al, 2010). Si bien las enterotoxinas provocan cambios en el metabolismo del fluido intestinal, no producen lesiones patológicas ni cambios morfológicos en la mucosa intestinal (Gyles et al, 2010).

1.2.2 Escherichia coli enteropatogénica

EPEC causa diarrea no invasiva en el ser humano y en distintas especies animales como bovinos, cerdos, perros, entre otros, y se encuentra especialmente asociada a la DNT en terneros neonatos (Gyles et al, 2010). Las cepas de EPEC inducen lesiones características en la mucosa intestinal cuando se adhieren de forma íntima al epitelio. Como consecuencia de esta unión, se “borran” las microvellosidades del intestino y se forman estructuras en forma de “pedestal”. Este tipo de unión, llamado de adhesión y borramiento (A/E, *attachment and effacement*) está presente además en algunas cepas de STEC. La capacidad de unirse de forma íntima y de borrar las vellosidades intestinales está codificada en la isla de patogenicidad LEE (del inglés *locus of enterocyte effacement*), la cual codifica las proteínas del sistema de secreción de tipo III (SST3), involucradas en la adherencia íntima de la bacteria al epitelio del hospedador y en la transducción de señales en el enterocito (Nataro y Kaper 1998; Dean y Kenny, 2009).

La isla de patogenicidad LEE de *E. coli* O157 es una de las más estudiadas. Consta de un fragmento de ADN de 36,5 kb y contiene 41 genes, organizados en cinco operones (LEE 1–5). Uno de sus genes más importantes es el gen *eae*, que codifica la proteína de membrana íntima (Eae), la que funciona como adhesina y es inductora de respuestas inmunes TH1 en el hospedador, entre otras funciones. Actualmente, se reconocen al menos 21 variantes de íntima en STEC y EPEC debido a variaciones en la secuencia de aminoácidos, principalmente en la región C-terminal de la proteína (Gyles et al, 2010).

1.2.3 E. coli necrotoxigénica y E. coli de adherencia difusa

Otros patotipos que pueden encontrarse asociados a diarrea en terneros son NTEC y DAEC (Gyles y Fairbrother, 2010). DAEC incluye cepas de *E. coli* diarreogénicas que si bien se adhieren al epitelio intestinal no presentan un patrón clásico de adhesión en cultivos de células Hep-2, como sí lo tienen las cepas del grupo A/E (Croxen et al, 2013). Esta adherencia está mediada por la adhesina AIDA, uno de sus principales factores de virulencia, la cual también se encuentra presente en cepas de ETEC y STEC. Por otro lado, el patotipo NTEC, perteneciente al grupo de las ExPEC, se define por la producción de factores necrotizantes citotóxicos (CNFs, del inglés *cytotoxic necrotizing factors*) así como varias adhesinas fimbriales y no fimbriales. En particular la variante NTEC1 es responsable de infecciones diarreogénicas y de infecciones extraintestinales en animales domésticos y de granja (De Rycke et al, 1999).

1.2.4 *E. coli productora de toxina Shiga*

Las cepas STEC son altamente patogénicas para los seres humanos, y los bovinos y otros rumiantes son su principal reservorio (Gyles et al, 2010). Es un patógeno zoonótico causante de enfermedad diarreica, la cual puede variar desde infecciones leves hasta síndromes más complejos como la Colitis Hemorrágica (CH) y el Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) (Tozzoli y Scheutz, 2014). Usualmente se propaga a través de la ruta fecal-oral, directamente a través del contacto con heces de animales colonizados, o indirectamente a través de alimentos y agua contaminados (Caprioli et al, 2005; Daly et al, 2016). Si bien su principal reservorio es el rumen o intestino de los bovinos se ha aislado también de animales domésticos como cabras, caballos, perros, corderos y cerdos (Gyles et al, 2010; Mainil y Fairbrother, 2014).

La mayor cantidad de las infecciones que se detectan en los seres humanos se deben al consumo de carne poco cocida, vegetales y productos lácteos contaminados y al contacto con agua contaminada, pero también se han reportado infecciones debidas al contacto directo con animales y con el ambiente donde se encuentran los rumiantes y debidas al contacto de persona a persona (Erickson et al, 2007; Kintz et al, 2017). Asimismo, STEC puede causar enfermedad en los animales, asociándose a casos de diarrea en terneros jóvenes (Mainil y Fairbrother, 2014).

1.2.5 *Clasificación de las Toxinas Shiga*

Las toxinas Shiga son los principales factores de virulencia que caracterizan a las STEC (Croxen et al, 2013). Pertenecen al grupo de proteínas AB₅ y están formadas por una subunidad A con actividad ARN-glicosidasa y 5 unidades B idénticas que median la unión con el receptor globotriaosylceramida (Gb₃) de las células eucariotas (Melton-Celsa, 2014). Su función es inhibir la síntesis proteica en células eucariotas lo cual realizan mediante la formación de un complejo y remoción de un residuo de adenina del ARN ribosómico 28S de la subunidad 60S, modificando así el sitio de acoplamiento del aminoacil ARNt (Juillot y Romer, 2014).

Se clasifican en dos tipos, Stx1 y Stx2, donde hasta el momento Stx1 tiene 4 subtipos (a, c, d, e) (Probert et al, 2014), y Stx2 tiene 11 subtipos (a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k) (Yang et al, 2020). Las cepas de STEC pueden expresar una o ambas variantes en simultáneo, o incluso una combinación de subtipos de un mismo tipo (Croxen et al, 2013). Stx1 y Stx2 son codificadas en bacteriófagos tipo lambda (profagos) integrados al cromosoma, los cuales pueden volverse líticos en situaciones de estrés. Además, estas toxinas podrían ser liberadas por células bacterianas lisadas durante el ciclo lítico del fago (Croxen et al, 2013). Tanto las STEC que expresan Stx1 como las que expresan Stx2 pueden provocar enfermedad en los seres humanos, así como diarrea en terneros y cerdos (Croxen et al, 2013). Aunque, se ha demostrado que la gravedad de los brotes que pueden causar depende del subtipo de toxina que expresa una

cepa. Con respecto a esto, los subtipos Stx2a y Stx1a se asocian comúnmente con enfermedades muy graves en humanos (Scheutz, 2014).

1.2.6 Ingreso al organismo y mecanismo de acción de las toxinas Shiga

Típicamente, Stx se produce en el colon de los animales infectados y puede viajar a través del torrente sanguíneo hasta el riñón donde daña las células endoteliales y altera la microvasculatura. El mecanismo de acción de la toxina incluye la unión de la Stx a su receptor glicolípidido de alta afinidad, globotriaosilceramida (Gb3), en la superficie de las células epiteliales o endoteliales del huésped, para luego ser internalizado por endocitosis mediada por el receptor (Fig. 2). Luego de la transferencia retrógrada a través del aparato de Golgi, la toxina se asocia con el retículo endoplasmático rugoso, desde el cual es liberada al citosol (Sandvig y Van Deurs, 2002). Durante el transporte de Stx, el clivaje de la unidad A por la enzima furina y la reducción de un puente disulfuro resulta en la separación de un pequeño fragmento A2 del fragmento A1 (27 kDa). A continuación, el fragmento A1 interactúa con el fragmento A2 y cataliza la remoción de un residuo, específico de adenina, lo que finalmente provoca la inhibición de la síntesis de proteínas. Esta inhibición involucra la terminación de la cadena peptídica en la etapa de unión del aminoacil-ARNt al sitio aceptor del ribosoma, lo que resulta letal para la célula hospedadora (Suh et al, 1998). Asimismo, se ha reportado que las toxinas Shiga también inducen vías de señalización que resultan en apoptosis celular (Heyderman et al, 2001) (Fig. 2).

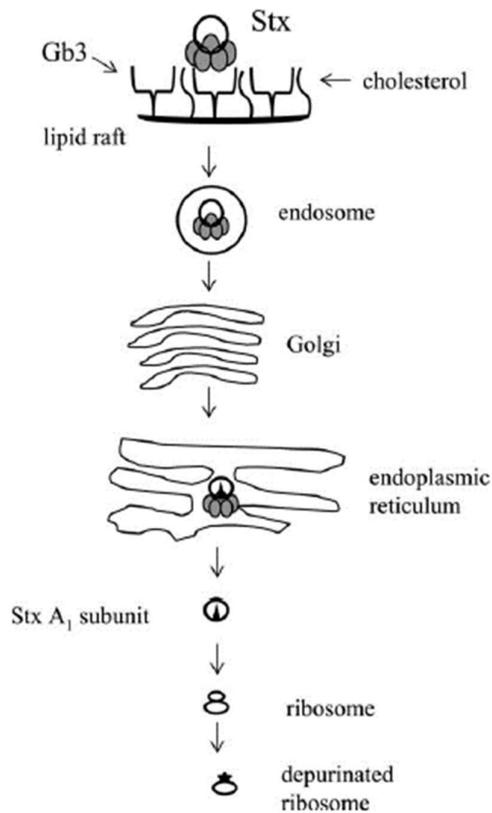


Figura 2. Vía retrograda de ingreso de la toxina Shiga a la célula del hospedador. Tomada de Melton- Celsa, 2014.

1.2.7 *STEC LEE-positivas y STEC LEE-negativas*

Además de la producción de Stx, la mayoría de estas cepas contienen la isla de patogenicidad LEE que codifica para el SST3 y proteínas efectoras. Como se explicó previamente, dichas proteínas le dan la capacidad de producir lesiones del tipo A/E en las vellosidades intestinales (Nataro y Kaper, 1998; Kaper y O'Brien, 2014). Las cepas STEC que presentan esta isla de patogenicidad se denominan STEC-LEE positivas, mientras que las cepas STEC que carecen de dicha isla se denominan STEC-LEE negativas (Nataro y Kaper, 1998).

1.3 *Colitis Hemorrágica y Síndrome Urémico Hemolítico*

Dentro de las enfermedades causadas en los seres humanos por cepas de STEC (tanto LEE positivas como LEE negativas) se destaca la CH y el SUH (Lukjancenko et al, 2010; Kaper y O'Brien, 2014). La sintomatología de la CH puede variar de paciente a paciente, incluyendo calambres abdominales severos, deposiciones sanguinolentas, fiebre baja o ausencia de ella y evidencia de edema mucosal colónico, erosión y hemorragia. Por otro lado, el SUH fue descrito por primera vez por Gasser y

colaboradores (1955) en Suiza, como un síndrome cuyos síntomas incluyen falla renal aguda, trombocitopenia y anemia hemolítica microangiopática (Von Gasser et al, 1955). En 1983, Karmali y colaboradores relacionaron la ocurrencia de casos de SUH con la presencia de cepas STEC en las deposiciones de los pacientes. Desde entonces, un gran número de brotes de SUH se han reportado mundialmente, algunos de ellos con elevados índices de morbimortalidad (Kaper et al, 2004).

Actualmente, el SUH es una de las mayores causas de falla renal aguda en niños a nivel mundial (Croxen et al, 2013), siendo responsable de 2,8 millones de infecciones, 3890 casos de SUH y 230 muertes por año (Galarce et al, 2020). En Uruguay, al igual que en Brasil, no son frecuentes los casos de SUH ni de CH, y en particular los casos de SUH tienen una incidencia de 4 o 5 cada 100.000 niños (Blanco et al, 2004). Por otro lado, en Argentina, considerado el país con mayor incidencia de SUH en niños menores de 5 años, se reportan 300/400 casos al año (Blanco et al, 2004).

Las cepas de STEC pueden ser transmitidas a los seres humanos a través del agua contaminada, alimentos o de persona a persona. En la mayoría de los casos reportados, la causa de contagio se debe al consumo de alimentos contaminados, particularmente carne de origen bovino (Nataro y Kaper, 1998). Actualmente, en países como Japón, si un paciente con SUH presenta toxina Shiga en las heces, anticuerpo aglutinante de antígeno O ó anticuerpo anti-toxina Shiga en el suero debe ser reportado a las autoridades de la salud como infectado por STEC/enterohemorrágica (Terajima et al, 2014). En Uruguay, desde el año 2008 los casos de SUH son de denuncia obligatoria. Sin embargo, al no figurar como entidad claramente definida, el equipo de salud no los reconoce como sujeto a notificación obligatoria y por lo tanto no denuncia todos los casos, lo que determina que no haya un registro adecuado de los mismos (Decreto N° 41/012, MSP).

1.4 Serogrupos y brotes por STEC

Una de las técnicas más utilizadas para clasificar las distintas cepas de *E. coli* es la serotipificación. La misma se basa en las diferencias antigénicas observadas en el antígeno O (porción más externa del lipopolisacárido), y el antígeno H (proteínas flagelares) presentes en cada cepa. Actualmente se describen 174 antígenos O y 53 antígenos H distintos, los cuales varían según su frecuencia y sintomatología (Gyles et al, 2010). Tradicionalmente, para la identificación de los serogrupos se necesitaba contar con antisueros para todos los antígenos existentes. Hoy en día, además, se pueden determinar los serotipos de STEC (composición del antígeno O) mediante técnicas de biología molecular (PCR) o secuenciación genómica (Gyles et al, 2010).

La relevancia de STEC en la salud pública fue reconocida en 1982, cuando surgieron 2 brotes en Estados Unidos asociados al consumo de hamburguesas de una reconocida cadena de comida rápida contaminadas con *E. coli* O157:H7, un serotipo considerado infrecuente hasta el momento (Scheutz, 2014). Otros ejemplos de

importantes brotes son el ocurrido en 1999 debido al consumo de agua contaminada, con 781 personas infectadas, considerado el mayor ocurrido en Estados Unidos hasta el momento (Rangel et al, 2005). En 2006, tuvo lugar un brote causado por espinaca contaminada, relevante debido a que el 29% de los pacientes desarrollaron SUH, reflejando un aumento en su incidencia con respecto a brotes anteriores (15-20% de los pacientes) (Pacheco et al, 2012). En 2011, en Alemania, el consumo de coles contaminados dio lugar a uno de los mayores brotes de gastroenteritis y SUH reportados hasta el momento, en el que 54 personas fallecieron. Las semillas de los coles se encontraban contaminadas con *E. coli* productora de toxina Shiga del serotipo O104:H4, un serogrupo que hasta ese momento no estaba relacionado a STEC, pero que adquirió la capacidad de expresar las toxinas Shiga (Scheutz, 2014; Burger, 2012). El mismo año, en Japón ocurrió un gran brote provocado por O111:H8 en el que 5 pacientes fallecieron (Terajima et al, 2014).

1.5 Grupos filogenéticos de *Escherichia coli*

Menos de 2000 genes de los entre 4200 y 5500 que posee *E. coli* en su genoma son conservados entre todas las cepas de la especie (genoma *core*). Además, estudios del repertorio del pan genoma muestran que comprende 15741 familias génicas, de las cuales sólo el 6% se encuentran representadas en todos los genomas. De esta manera, el genoma variable o accesorio conforma más del 90% del pan genoma y un 80% de un genoma típico (Lukjancenکو et al, 2010). Las mutaciones, inserciones, deleciones, rearrreglos, duplicación y el flujo continuo de genes localizados en elementos móviles como transposones, integrones, bacteriófagos, plásmidos, elementos de inserción o islas de patogenicidad dan lugar a nuevas combinaciones de genes que aceleran la adaptación de *E. coli* a variados ambientes y estilos de vida, llevando al surgimiento de nuevas cepas más virulentas y con capacidad de causar enfermedad (Muniesa et al, 2014).

Existen varias formas de abordar la clasificación de las distintas cepas de *E. coli*. Una de ellas es, como se mencionó más arriba, la serotipificación. Por otro lado, las técnicas moleculares son una forma rápida de detectar e identificar los diferentes patotipos. La detección de los distintos genes de virulencia permite ubicar las cepas en grupos definidos como son el grupo de las DEC o ExPEC, de acuerdo con la combinación de genes que presenta (Croxen et al, 2013). Es una técnica ampliamente utilizada y aceptada. Sin embargo, y debido al flujo continuo de genes de virulencia presentes en plásmidos, fagos y elementos de inserción, cada vez se hace más compleja la determinación de patotipos.

Por otro lado, y a pesar de la gran diversidad de fenotipos y de combinaciones de factores de virulencia, la estructura poblacional de *E. coli* permanece mayoritariamente clonal (Touchon et al, 2009). Actualmente, las cepas de *E. coli*, tanto las patógenas del grupo DEC y ExPEC como las comensales, pueden agruparse en ocho grupos filogenéticos, siete de los cuales pertenecen a *E. coli sensu*

stricto (A, B1, B2, C, D, E, F) y uno corresponde a *E. coli* clado I (Clermont et al, 2013). En este sentido, en su trabajo de 2013, Clermont y colaboradores desarrollaron un método de PCR múltiple que permite asignar una determinada cepa de *E. coli* al filogrupo al cual pertenece. Es un método rápido y sencillo de realizar, y en los casos en que dicha PCR no permite la asignación directa a un filogrupo, se determinaron amplificaciones adicionales para la confirmación adecuada del filogrupo (Tabla 1).

Tabla 1: Genotipos cuádruples y pasos requeridos para asignación de *E. coli* a grupos filogenéticos sugeridos por Clermont y colaboradores (2013).

<i>arpA</i> (400 pb)	Genotipo cuádruple			Filogrupo	Paso confirmatorio
	<i>chuA</i> (288 pb)	<i>yjaA</i> (211 pb)	<i>tspE4.C2</i> (152 pb)		
+	-	-	-	A	----
+	-	-	+	B1	----
-	+	-	-	F	----
-	+	+	-	B2	----
-	+	+	+	B2	----
-	+	-	+	B2	----
+	-	+	-	A o C	PCR grupo C (si da negativo es A)
+	+	-	-	D o E	PCR grupo E (si da negativo es D)
+	+	-	+	D o E	PCR grupo E (si da negativo es D)
+	+	+	-	E o Clado I	PCR grupo E y con cebadores de clado tríptico
-	-	+	-	Clado I o II	PCR con cebadores de clado críptico
-	-	-	-	Clado III, IV o V	PCR con cebadores de clado críptico
-	-	-	+	Desconocido	MLST
-	-	+	+	Desconocido	MLST
+	-	+	+	Desconocido	MLST
+	+	+	+	Desconocido	MLST
-	-	-	-	Desconocido	Confirmar <i>E. coli</i> con genes <i>uidA</i> o <i>gadA/Bd</i> . Si da positivo, confirmar con cebadores de clado críptico y/o MLST

Los genes utilizados en esta metodología son *chuA*, *yjaA*, *tspE4.C2* y *arpA* (Fig. 3). El gen *chuA* codifica para un transportador hemo en *E. coli* O157:H7 y está presente en todas las cepas pertenecientes a los filogrupos B2 y D. El gen *yjaA*, cuya función es desconocida, fue inicialmente identificado en *E. coli* K-12 y permite una perfecta discriminación entre las cepas del grupo B2 (100% positivas) y las cepas del grupo D (100% negativas). El fragmento *tspE4.C2*, perteneciente a la librería de los desarrolladores de esta técnica y que fue caracterizado en 2008 por Gordon y colaboradores como un posible gen estearasa lipasa (Gordon et al, 2014), permite distinguir las cepas pertenecientes al grupo B1 (en las cuales está presente) y el grupo A (en las que no se encuentra presente). Finalmente *arpA* es un gen que actúa como control interno de la calidad del ADN ya que con su adición se espera que todas las cepas de *E. coli* y Clado I presenten al menos un producto de PCR cuando es analizada con la PCR cuádruple. Además, permite la distinción de los filogrupos F y D ya que este gen se encuentra en todos los filogrupos a excepción de B2 y F (Clermont et al, 2013).

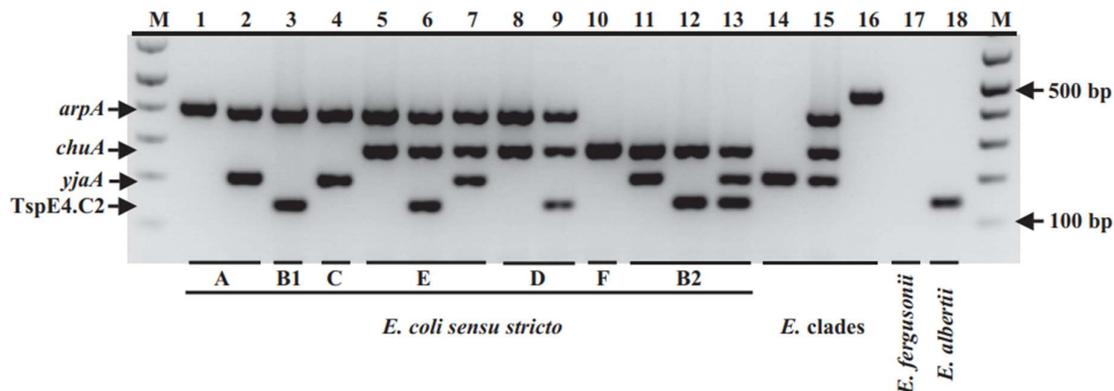


Figura 3. Perfiles de PCR cuádruple del nuevo método de tipificación de Clermont. Tomada de Clermont et al, 2013.

Gracias a la aplicación de esta técnica, las cepas virulentas del grupo ExPEC se han asignado mayormente al grupo B2 y en menor medida al D, mientras que las comensales al grupo A (Bingen et al, 1998, Chakraborty et al, 2015). Por otro lado, los patotipos diarreogénicos del grupo DEC se ha visto que derivan de los filogrupos A, B1 ó D (Russo et al, 2000). De la mano de estos resultados, se ha reportado que en los mamíferos existiría una asociación entre el clima donde habita el animal, su dieta y su peso corporal, con la abundancia relativa de cepas de *E. coli* pertenecientes a los filogrupos A, B1, B2 y D, sugiriendo que los distintos grupos pueden tener distintos nichos (Gordon et al, 2008).

Acorde a todo lo expuesto, la clasificación de las cepas de *E. coli* a partir de la asignación de grupos filogenéticos resultaría muy efectiva para una rápida aproximación al patotipo y su posible rol como agente primario de diarrea.

1.6 Resistencia a los antibióticos - emergencia sanitaria

Los antibióticos han sido utilizados desde su descubrimiento tanto en la medicina humana como veterinaria para tratar y prevenir diversas enfermedades infectocontagiosas. Casi simultáneamente con su descubrimiento, comenzaron a detectarse resistencias a los mismos. Una de las razones del aumento en las resistencias es el uso indiscriminado de antibióticos, automedicación y tratamientos inadecuados e inconclusos, lo que ha acarreado importantes problemas de salud, así como grandes pérdidas económicas en la clínica humana y en el sector productivo (Constable et al, 2004). Es importante resaltar también que, en el contexto de la clínica veterinaria, por décadas, los antibióticos se administraron en dosis subterapéuticas en los terneros como “promotores de crecimiento” aunque su uso ya

fue prohibido en la Unión Europea (Berge et al, 2005). En nuestro país rige desde 2011 un decreto que prohíbe su utilización en bovinos y ovinos (N° 98/011).

La iniciativa “Una Salud”, desplegada por la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) es un plan de acción mundial que busca vincular los conceptos salud animal-salud humana, instrumentar la vigilancia de enfermedades infecciosas en un marco de interacción hombre-animal-ambiente (Shrivastava et al, 2018). La OMS liberó una lista de patógenos prioritarios resistentes a antibióticos que incluye doce grupos de bacterias clasificadas en tres categorías: de relevancia crítica, de relevancia alta y de relevancia media. Esta iniciativa permite materializar la vigilancia mundial, mejorar la conciencia, y establecer estrategias efectivas para disminuir el aumento de las enfermedades infecciosas y disminuir la ocurrencia de resistencias a los antimicrobianos. Asociado a esto, podemos encontrar a las enterobacterias resistentes a carbapenems y cefalosporinas de tercera generación dentro del grupo de microorganismos críticos, entre otros. (<http://www.oie.int/en/for-the-media/onehealth/>). (Fig.4).

En la 6° revisión de su lista de antimicrobianos de importancia crítica para la medicina humana, la OMS clasificó los antibióticos de uso humano en tres grandes grupos (importancia crítica, muy importantes e importantes) de acuerdo con su importancia para la salud humana, muchos de los cuales son utilizados en el ámbito veterinario. Dicha lista, considera a cefalosporinas (de tercera, cuarta y quinta generación), polimixinas, quinolonas, entre otros, como antibióticos de importancia crítica. El objetivo de esta es, entre otras acciones, la reducción general del uso de todas las clases de antimicrobianos de importancia médica en los animales destinados a la producción de alimentos y una restricción completa del uso de todas las clases de antimicrobianos de importancia médica para estimular el crecimiento de los animales destinados a la producción de alimentos (OMS, 2017) (Fig. 4).

		Clase de antimicrobiano	Criterio / Factor de priorización (Sí=●)				
		ANTIMICROBIANOS DE IMPORTANCIA CRÍTICA	C1	C2	P1	P2	P3
De importancia crítica	<i>MÁXIMA PRIORIDAD</i>						
	Máxima prioridad	<i>Cefalosporinas (de tercera, cuarta y quinta generación)</i>	●	●	●	●	●
		<i>Glicopéptidos</i>	●	●	●	●	●
		<i>Macrólidos y cetólidos</i>	●	●	●	●	●
		<i>Polimixinas</i>	●	●	●	●	●
		<i>Quinolonas</i>	●	●	●	●	●
	<i>GRAN PRIORIDAD</i>						
		<i>Aminoglucósidos</i>	●	●		●	●
		<i>Ansamicinas</i>	●	●	●	●	
		<i>Carbapenémicos y otros penémicos</i>	●	●	●	●	
		<i>Gliciliclinas</i>	●	●	●		
		<i>Lipopéptidos</i>	●	●	●		
		<i>Monobactámicos</i>	●	●	●		
		<i>Oxazolidinonas</i>	●	●	●		
		<i>Penicilinas (antipseudomonales)</i>	●	●		●	
		<i>Penicilinas (aminopenicilinas)</i>	●	●		●	●
		<i>Penicilinas (aminopenicilinas con inhibidores de la β-lactamasa)</i>	●	●		●	●
		<i>Derivados del ácido fosfónico</i>	●	●	●	●	
		<i>Fármacos para tratar únicamente la tuberculosis/enfermedades micobacterianas</i>	●	●	●	●	
	Muy importantes	ANTIMICROBIANOS MUY IMPORTANTES					
		<i>Amidinopenicilinas</i>		●			
		<i>Cefalosporinas (de primera y segunda generación) y cefamicinas</i>		●			
		<i>Lincosamidas</i>		●			
		<i>Penicilinas (amidinopenicilinas)</i>		●			
		<i>Penicilinas (antiestafilocócicas)</i>		●			
		<i>Penicilinas (de espectro reducido)</i>		●			
		<i>Ácidos pseudomónicos</i>		●			NA
		<i>Riminoferazinas</i>	●				
		<i>Antibacterianos esteroides</i>		●			
		<i>Estreptograminas</i>		●			
		<i>Sulfonamidas, inhibidores de la dihidrofolato-reductasa y combinaciones</i>		●			
		<i>Sulfonas</i>	●				
	<i>Tetraciclinas</i>	●					
Importantes	ANTIMICROBIANOS IMPORTANTES						
		<i>Aminociclitolos</i>					
		<i>Polipéptidos cíclicos</i>					
		<i>Nitrofurantoinas</i>					NA
		<i>Nitroimidazoles</i>					
		<i>Pleuromutilinas</i>					

C1	Criterio 1
Clase de antimicrobianos que constituye uno de los pocos o el único tratamiento disponible para tratar infecciones bacterianas graves en humanos.	
C2	Criterio 2
Clase de antimicrobianos utilizada para tratar infecciones humanas causada por: 1) bacterias que pueden ser transmitidas a los humanos a partir de fuentes no humanas, o 2) bacterias que pueden adquirir genes de resistencia a partir de fuentes no humanas.	
P1	Factor de priorización 1
Gran número de personas en la comunidad o en determinados grupos de alto riesgo (por ejemplo, pacientes con infecciones graves en centros sanitarios) afectadas por enfermedades para las cuales son muy pocos los antimicrobianos que se pueden elegir.	
P2	Factor de priorización 2
Clase de antimicrobianos de uso muy frecuente en cualquier indicación médica humana o en determinados grupos de alto riesgo (por ejemplo, pacientes con infecciones graves en centros sanitarios), dado que dicho uso puede favorecer la selección de resistencias.	
P3	Factor de priorización 3
Clase de antimicrobianos que se utiliza para tratar infecciones humanas en las que ya hay numerosas pruebas de la transmisión de bacterias resistentes (por ejemplo, especies de <i>Salmonella</i> spp. no tifoides y <i>Campylobacter</i> spp.) o genes de resistencia (<i>E. coli</i> y <i>Enterococcus</i> spp.) a partir de fuentes no humanas.	

Figura 4. Categorización y priorización de los antimicrobianos clasificados como importantes, muy importantes o de importancia crítica. Tomada de 6ª revisión de la Lista OMS de Antimicrobianos de Importancia Crítica para la Medicina Humana.

Los antibióticos más utilizados en animales incluyen los β-lactámicos, aminoglucósidos y fluoroquinolonas (Constable et al, 2004), que a su vez son muy utilizados para el tratamiento de enfermedades infecciosas en los seres humanos, por lo que el mal uso de estos puede tener un impacto directo en la salud humana. Algunos ejemplos de esto se reportan en trabajos donde se han detectado restos de ciprofloxacina en productos derivados de animales de consumo, como leche,

pescado, riñones, hígado de ternero, gallina y cerdo (Cheng et al, 2014). Asimismo, se ha demostrado con respecto a oximiinocefalosporinas, cloranfenicol y fluoroquinolonas, que pequeños aumentos en su utilización a nivel veterinario se reflejan en un gran aumento de resistencia antimicrobiana en *E. coli* aisladas de animales para el consumo humano (Chantziaras et al, 2014). En particular, en países de la región como Chile, ya se ha reportado la ocurrencia de cepas de STEC que presentan resistencia contra antimicrobianos considerados críticos en la medicina tanto humana como veterinaria, representando una amenaza para la salud pública y animal (Galarce et al, 2020).

1.7 Mecanismos de resistencia

En lo que refiere a los tipos de resistencia, existen diversos mecanismos capaces de conferir resistencia antibiótica. Éstos podemos dividirlos en mecanismos intrínsecos o adquiridos. La resistencia intrínseca ocurre cuando una especie, grupo o familia bacteriana es resistente a un antibiótico en particular o incluso a todos los miembros de una clase antibacteriana en particular, lo cual no es variable para la población bacteriana. Tal es el caso de la resistencia natural a la vancomicina por parte de los Gram negativos (Breijyeh et al, 2020). Por otro lado, la resistencia adquirida resulta de la ocurrencia de mutaciones al azar o por la adquisición de nuevo material genético. Una simple mutación en un gen clave puede reducir la sensibilidad de la bacteria a un agente antibacteriano, siendo suficiente para permitir la supervivencia inicial de microorganismos hasta que adquiera mutaciones o información genética adicional, resultando en una resistencia. Además, la presencia de mecanismos de resistencia en elementos génicos móviles o movilizadores, como plásmidos, integrones, transposones o secuencias de inserción, favorecen la diseminación horizontal de los genes de resistencia entre células bacterianas pertenecientes a especies distintas o relacionadas entre sí (Tenover et al, 2006). Las variantes pueden volverse dominantes y diseminarse entre los diferentes hospederos animales. Cuanto mayor sea el uso de antibióticos, mayor es la posibilidad de que las cepas patógenas adquieran resistencia a los mismos (Phillips et al, 2003).

Existen diferentes mecanismos de resistencia a la acción de los antimicrobianos por parte de los microorganismos:

- 1) Inactivación enzimática: puede producirse por hidrólisis o por modificaciones no hidrolíticas tales como las acetilaciones, adenilaciones o fosforilaciones inactivantes de aminoglucósidos. Ej: enzimas Aac(6')Ib acetilantes de aminoglucósidos en *E. coli* (Robicsek et al, 2006).
- 2) Modificaciones en el sitio blanco: la alteración del sitio blanco por mutaciones puntuales de los genes codificantes o debido a procesos de recombinación es uno de los principales mecanismos de resistencia descrito. En este mecanismo ocurre la alteración de un gen que codifica para una proteína que sustituye

funcionalmente a las moléculas inhibidas por el antibiótico o genera la hiperproducción de moléculas blanco. Ej: modificación del PBP (del inglés *penicilin binding proteins*) en *Streptococcus pneumoniae* (Hakenbeck et al, 1999).

- 3) Alteraciones de la permeabilidad: éstas se deben a la pérdida de expresión de proteínas de membrana externa o porinas. Los antibióticos son capaces de atravesar la membrana a través de estas proteínas localizando luego su sitio blanco. Su pérdida de expresión lleva a un menor volumen de entrada de antibióticos. Ej: pérdida de la porina OprD en aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* (Vila et al, 2010).
- 4) Bombas de expulsión activa: las bombas de eflujo consisten en complejos proteicos transmembrana que llevan a la expulsión del antibiótico. Es considerado un mecanismo inespecífico, que afecta a diferentes grupos de antibióticos como β -lactámicos, quinolonas, tetraciclinas y cloranfenicol. Ej: bombas AcrB en *E. coli* (French et al, 2008).

Brevemente mencionaremos los principales grupos de antibióticos utilizados en la práctica humana y animal, y los mecanismos de resistencia involucrados.

1.7.1 β -lactámicos

Estos antibióticos comprenden una de las principales familias de antibióticos ampliamente utilizados en la práctica clínica. Pueden ser de origen natural o semisintéticos y poseen un anillo β -lactámico en su estructura. Actúan inhibiendo la última etapa de la síntesis del peptidoglicano siendo así bactericidas. Se clasifican en cuatro subgrupos: penicilinas, cefalosporinas (primera a quinta generación), monobactams y carbapenemes (Vignoli et al, 2019).

La resistencia a β -lactámicos pueden estar dada por tres mecanismos: alteración del sitio blanco de acción; trastornos de permeabilidad y bombas de eflujo; e hidrólisis enzimática mediada por β -lactamasas, siendo este último el principal mecanismo observado (Murray et al, 2016).

Las β -lactamasas atacan la unión amida del anillo β -lactámico produciendo la hidrólisis de este con la pérdida total de actividad antibiótica de la molécula (Mandell et al, 2015).

Desde el punto de vista estructural existen cuatro clases de enzimas, pero el análisis de las secuencias de los genes codificantes muestra que, hoy en día existen más de 300 enzimas surgidas como resultado de mutaciones puntuales que involucran, fundamentalmente, el sitio activo de las mismas y que en general alteran el perfil de β -lactámicos capaz de hidrolizar. Puesto que muchos de estos genes se encuentran

asociados a elementos genéticos móviles como integrones y transposones tanto en plásmidos o en el cromosoma, las β -lactamasas se han diseminado en una gran variedad de especies (Catarina et al, 2010).

1.7.2 Quinolonas

Las quinolonas comprenden un grupo de antibióticos enteramente sintéticos cuyo sitio blanco de acción son las ADN girasas y las topoisomerasas de tipo IV. Estas enzimas se encuentran codificadas por los genes *gyrA* y *gyrB* o *parC* y *parE*, y son responsables de generar el superenrollamiento del ADN bacteriano; reducir la tensión topológica durante la replicación y transcripción; y liberación del ADN concatenadas luego de la replicación. La formación del complejo ADN clivado-girasa-quinolona lleva a un desalineamiento del ADN impidiendo la replicación de este, y dado la falta de religado del ADN una vez clivado, el efecto de este antibiótico es bactericida (Drlica et al, 1997).

A su vez, las quinolonas pueden subdividirse en generaciones. La primera generación incluye al ácido nalidíxico y al ácido pipemídico; la segunda generación, quienes agregan un grupo flúor en el carbono 6 incluyen la norfloxacin y ciprofloxacina; la tercera generación, levofloxacina y gatifloxacina; y cuarta generación, moxifloxacina y trovafloxacina (Oliphant et al, 2002).

Uno de los principales mecanismos de resistencia a las quinolonas se debe a la acumulación de mutaciones en los genes *gyrA/B* y *parC/E*. Estos mecanismos, junto con el aumento de la impermeabilidad bacteriana o sobreexpresión de bombas de eflujo, tradicionalmente fueron clasificados como de origen cromosómico. Sin embargo, a partir de 1998, se comenzaron a describir una serie de mecanismos de resistencia transferibles (Rodríguez et al, 2016).

El primer mecanismo de resistencia plasmídica a quinolonas se denominó Qnr. Esta proteína es capaz de unirse a la girasa y alterar la conformación del bolsillo de unión al antibiótico, de tal manera, que este reconozca su sitio menos eficientemente. Hoy en día se describen una gran variedad de proteínas Qnr: QnrA, QnrB, QnrS, QnrC, QnrE, QnrD y QnrVC (Rodríguez et al, 2016). Por otro lado, se han descrito mecanismos transferibles de resistencia a quinolonas codificantes de bombas de expulsión activa como *ser*, *qepA* y *oqxAB* (Hansen et al, 2007; Yamane et al, 2007).

1.7.3 Aminoglucósidos

Los aminoglucósidos son antibióticos que presentan dos o más aminoazúcares unidos por enlaces glucosídicos a un anillo aminociclitol y dentro del grupo se distinguen las familias; Estreptomina, Kanamicina, Gentamicina y Neomicina. Actúan bloqueando la síntesis proteica de la bacteria mediante la unión con la subunidad 30S del ribosoma, interfiriendo con la lectura correcta del código genético (Murray et al, 2016).

La resistencia transferible a aminoglucósidos está dada fundamentalmente por inactivación enzimática y modificaciones postranscripcionales del sitio blanco (metilación del ribosoma bacteriano). Se describen tres grandes grupos de enzimas capaces de inactivar aminoglucósidos: N-acetiltransferasas (AAC), O-nucleotidiltransferasas (ANT) y O- fosfotransferasas (APH) (Ramírez et al, 2010).

Una variante de gran importancia es la variante alélica AAC(6')Ib-cr, la cual confiere resistencia a kanamicina, amikacina y tobramicina, además de agregar resistencia a fluoroquinolonas, como ser, ciprofloxacina y norfloxacina (Parck et al, 2006).

Recientemente, se ha descrito un mecanismo de resistencia a prácticamente todos los aminoglucósidos de uso clínico en humanos (a excepción de estreptomina). Este corresponde a un grupo de enzimas capaces de metilar el rRNA 16S bacteriano (ArmA, RmtA-D y NpmA) (Galimand et al, 2003).

1.8 Antecedentes en Uruguay

El estudio de *E. coli* como agente etiológico de la DNT es una línea de investigación del Depto. de Microbiología del IIBCE, desarrollada principalmente por una creciente demanda de conocimientos tanto desde un punto de vista científico como con un foco en la salud asociada a sistemas productivos a nivel nacional. Estudios realizados a partir de heces de terneros afectados con DNT, de terneros muertos y de terneros sanos, dirigidos a detectar y caracterizar molecularmente aislamientos de *E. coli* bovinos permitieron detectar genes de virulencia compatibles con los patotipos ETEC, NTEC, EPEC y STEC, con una alta prevalencia en animales sanos, lo que indicaría una circulación en el ganado de cepas patógenas tanto para los seres humanos como para los animales (Umpiérrez et al. 2016; 2017; 2020). Además, se ha determinado que los perfiles de virulencia de los aislamientos de *E. coli* asociados a mortalidad de terneros son diferentes de los perfiles que presentan los animales enfermos con DNT o los que están sanos, teniendo los asociados a mortalidad un perfil con mayor prevalencia de genes que codifican a toxinas que a fimbrias u otras adhesinas (Fernández et al, 2019). Asimismo, la clonalidad de aislamientos de STEC de origen bovino en Uruguay fue determinada por electroforesis en campo pulsado, donde se demostró que los mismos no están clonalmente relacionados (Umpiérrez et al, datos no publicados).

Si bien se propone en diversos trabajos una asociación entre los distintos patotipos y los diferentes grupos filogenéticos en *E. coli*, no hay estudios previos realizados al respecto en STEC de origen bovino en nuestro país.

Paralelamente, y en lo que respecta a la resistencia a antimicrobianos, estudios previos realizados en aislamientos de *E. coli* de otros patotipos, distintos de STEC, pero del mismo muestreo animal, han demostrado niveles de resistencia a fluoroquinolonas (36%). En esos aislamientos, se describe la presencia de los genes de resistencia a los mismos, *qnrB2* y *qnrS1*. Asimismo, en dicho trabajo se determinó que los niveles de resistencia a cefalosporinas de tercera generación fue del 3%, asociado a la presencia de *bla*_{CTX-M-14} (Umpiérrez et al, 2017). Mientras que, en muestreos similares, y en un periodo posterior, se detectaron aislamientos de *E. coli* portando los genes *qnrB19*, *qnrE1*, *qnrS1* y β -lactamasa de espectro extendido (BLEE) de tipo CTX-M-15 (Cóppola et al, 2020). Por otro lado, en muestras de STEC, NTEC y EPEC obtenidos de terneros muertos, se determinó que 44% de los aislamientos fueron resistentes a ciprofloxacina, encontrándose el gen *qnrB* (Fernández et al, 2019).

2. Objetivo general

Determinar los grupos filogenéticos de una colección de aislamientos de STEC aisladas de terneros menores a 35 días mediante la técnica de PCR convencional y caracterizar la resistencia a antibióticos y la ocurrencia de mecanismos de resistencia transferibles de dicha colección.

2.1 Objetivos específicos

- Poner a punto la técnica de PCR convencional para la detección de los genes *chuA*, *yjaA*, *tspE4.C2* y *arpA* de *E. coli*.
- Confirmar la identidad de las secuencias de los genes amplificados por secuenciación y comparación con los bancos de datos.
- Asignar las cepas a los grupos filogenéticos A, B1, B2, C, D, E y F de acuerdo con la presencia o ausencia de los genes *chuA*, *yjaA*, *tspE4.C2* y *arpA* de *E. coli*.
- Determinar los perfiles de resistencia a antimicrobianos
- Detectar la presencia de genes de resistencia transferibles en los aislamientos STEC de la colección analizada.

3. Estrategia experimental

3.1 Aislamientos de *E. coli* de origen bovino

Se analizó una colección de 20 aislamientos de *E. coli* STEC-LEE positivas del Departamento de Microbiología del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE), aisladas a partir de terneros afectados con DNT y terneros sanos (Tabla 2). La identificación primaria de los aislamientos de Artigas fue realizada en 2014 por investigadores del Depto. de Microbiología del IIBCE (Tabla 2), mientras que la colecta e identificación primaria de los aislamientos colectados en los departamentos de Colonia, San José y Florida entre 2015 y 2017 fue realizada por investigadores del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), La Estanzuela, en el marco de un proyecto de investigación en colaboración entre la Plataforma de Sanidad Animal y el Departamento de Microbiología del IIBCE (Tabla 2) (Umpiérrez et al, 2017; 2020). La subtipificación de las toxinas Shiga y la determinación de los serogrupos de dichos aislamientos fueron previamente realizados por nuestro grupo de trabajo (Ernst, 2017; Umpiérrez et al, datos no publicados).

3.2 Extracción de ADN

La extracción del ADN genómico se realizó por el método de lisis térmica. Todas las cepas se cultivaron a 37°C en placas de Agar Soya Tripticasa (TSA) durante 18-24 hs. Transcurrida la incubación, se picaron 5 colonias aisladas de cada aislamiento, las cuales se resuspendieron en 500 µL de agua destilada. Cada suspensión permaneció durante 10 minutos a 100°C y la fracción de ADN total se obtuvo mediante centrifugación. El ADN fue almacenado a -20°C hasta su uso.

La concentración y calidad del ADN obtenido se determinó usando Nanodrop (Thermo Scientific).

Tabla 2. Aislamientos de STEC utilizados en este trabajo, clasificados por animal y sintomatología, año de colecta, origen geográfico, subtipo de toxina Shiga y serogrupo determinado por PCR. n/d: no determinado.

Aislamiento	Animal	Síntomas DNT	Origen	Año	Subtipificación STEC-LEE +				Serogrupo (PCR)	
					stx1		stx2			Eae
					a	a+c	a	e		
1 (74.1)	1	si	Artigas	2014	X			X	O111	
2 (74.2)					X			X	O111	
3 (16.16)	2	mortalidad	Colonia	2015		X		X	O111	
4 (AG2.1)	3	si	Colonia	2016			X	X	n/d	
5 (AD 1.2)	4	si	San José	2016	X			X	n/d	
6 (AD1.5)						X		X	n/d	
7 (AD1.6)					X			X	n/d	
8 (AD1.7)						X		X	O111	
9 (AD1.9)						X		X	n/d	
10 (AD3.2)					5		X		X	O111
11 (AD 3.9)			X		X	O111				
12 (AD7.2)	6	si	San José	2016	X			X	n/d	
13 (AD 7.4)					X			X	O111	
14 (AD7.5)					X			X	n/d	
15 (AD7.10)					X			X	O111	
16 (AC3.1)	7	no	Colonia	2016		X		X	n/d	
17 (AC3.10)					X			X	O103	
18 (BJ1.3)	8	si	Florida	2017	X		X	X	O103	
19 (BJ1.5)						X	X	X	O103	
20 (BJ1.10)					X		X	X	O103	

3.3 PCR cuádruple

Se realizó la puesta a punto de la técnica de PCR cuádruple a tiempo final para la amplificación de los genes *chuA* (codifica para un transportador hemo), *yjaA* (función desconocida), *tspE4.C2* (gen estearasa lipasa) y *arpA* (proteína regulatoria *Ankyrin-like*), de acuerdo con lo establecido por Clermont y colaboradores (2013) (Tabla 3). Como controles positivos se utilizaron cepas de *E. coli* de los bancos maestros del Depto. de Microbiología del IIBCE y del Depto. de Bacteriología y Virología del Instituto de Higiene. Los productos de PCR fueron visualizados mediante la realización de electroforesis en geles de agarosa al 2%, posteriormente teñidos con GelRed y observados bajo luz UV.

La identidad de cada uno de los amplicones obtenidos se confirmó mediante el secuenciado de los mismos en el servicio brindado por MACROGEN (Corea del Sur). Las secuencias obtenidas se editaron con el programa bioinformático de libre acceso BioEdit (versión 7.5.0.3) y se evaluó su homología con las secuencias presentes en la base de datos pública del NCBI.

Tabla 3: Cebadores y condiciones de PCR utilizados para la determinación de los distintos grupos filogenéticos.

PCR	Cebador	Secuencia (5'--3')	Tamaño (pb)	Mezcla de reacción (vol. final 25 µl)	Ciclado	Referencia
Cuádruple	chuA.1b	ATGGTACCGGACGAACCAAC	288	2,5 µl de 10X 2 mM de dNTP 2 U de Taq polimerasa y 2 µl de ADN (concentración aproximada de 100 ng/ ml) Cebadores: 20 pmol, excepto para AceK.f (40 pmol) y, ArpA1.r (40 pmol).	4 minutos a 94°C, (5 segundos a 94°C, 20 segundos a 59°C, 20 segundos a 72°C) x30, 5 minutos a 72°C	Clermont et al, 2013
	chuA.2	TGCCGCCAGTACCAAAGACA				
	yjaA.1b	CAAACGTGAAGTGTCCAGGAG	211			
	yjaA.2b	AATGCGTTCCTCAACCTGTG				
	TspE4C2.1b	CACTATTTCGTAAGGTCATCC	152			
	TspE4C2.2b	AGTTTATCGCTGCGGGTCGC				
	AceK.f	AACGCTATTCGCCAGCTTGC	400			
ArpA1.r	TCTCCCCATACCGTACGCTA					
Grupo E	ArpAgpE.f	GATTCCATCTTGTCAAAATATGCC	301	2,5 µl de 10X 2 mM de dNTP 2 U de Taq polimerasa 2 µl de ADN (concentración aproximada de 100 ng/ ml) Cebadores: 20 pmol.	4 minutos a 94°C, (5 segundos a 94°C, 20 segundos a 57°C, 20 segundos a 72°C) x30, 5 minutos a 72°C	Clermont et al, 2013
	ArpAgpE.r	GAAAAGAAAAAGAATTCCCAAGAG				
Grupo C	trpAgpC.1	AGTTTTATGCCAGTGCGAG	219	2,5 µl de 10X 2 mM de dNTP 2 U de Taq polimerasa 2 µl de ADN (concentración aproximada de 100 ng/ ml) Cebadores: 20 pmol.	4 minutos a 94°C, (5 segundos a 94°C, 20 segundos a 59°C, 20 segundos a 72°C) x30, 5 minutos a 72°C	Clermont et al, 2013
	trpAgpC.2	TCTGCGCCGGTCACGCC				

3.4 Asignación de grupos filogenéticos

La asignación de los grupos filogenéticos de los aislamientos de STEC se realizó empleando PCR cuádruple, puesta a punto en este trabajo (Tabla 3). Una vez obtenidos los resultados, los mismos fueron analizados y se les asignó el grupo filogenético (A, B1, B2, C, D, E y F) de acuerdo con la presencia o ausencia de los genes *chuA*, *yjaA*, *tspE4.C2* y *arpA*, siguiendo los lineamientos propuestos por Clermont y colaboradores (2013) (Tabla 1).

Posteriormente, se analizó el genotipo obtenido con la correspondiente asignación del grupo filogenético. En los casos en los que no fue posible realizar la asignación de grupo a partir de la PCR cuádruple, se realizó la confirmación con cebadores específicos para dichos grupos de acuerdo con lo propuesto por Clermont y colaboradores (2013) (Tabla 1).

3.5 Estudios de susceptibilidad

Los estudios de susceptibilidad a antibióticos se realizaron por el método de disco-difusión de Kirby-Bauer en agar Müller-Hinton siguiendo las normas de *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)* y *VET08 (Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Test for Bacteria Isolated From Animal 2018)*. Se evaluó la resistencia a los siguientes antibióticos: ampicilina (AMP), cefuroxime (CXM), ácido nalidíxico (NA), ciprofloxacina (CIP), enrofloxacin (ENR), gentamicina (CN), amikacina (AK), trimetoprim-sulfametoxazol (SXT) y fosfomicina (FOT) (Oxoid). El control de calidad fue realizado utilizando la cepa de *E. coli* ATCC (American-Type Culture Collection) 25922.

3.6 Búsqueda de genes de resistencia transferible a fluoroquinolonas y fosfomicina

En aquellos microorganismos que se detectó resistencia a fluoroquinolonas y fosfomicina, se realizó la búsqueda de genes responsables de conferir estas resistencias mediante PCR. En el caso de los aislamientos resistentes a fluoroquinolonas se llevó a cabo la búsqueda de genes codificantes de las proteínas pentapeptídicas, Qnr (*qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD* y *qnrS*,) mientras que, para fosfomicina, los genes *fos* (*fosA*, *fosB*, *fomA*, *fomB*, *fosA3*, *fosC2* y *fosA7*) (Cóppola et al, 2020).

Las condiciones de amplificación para la identificación de los distintos genes de resistencia analizados se describen en las Tablas 4 y 5.

Tabla 4: Cebadores y condiciones de PCR utilizados para la determinación de genes de resistencia a quinolonas mediados por plásmidos.

Genes	Cebador	Secuencia (5'-3')	Tamaño	Mezcla de Reacción (Volumen final 25µl)	Ciclado	Referencia
<i>qnrB</i>	qnrB F	GATCGTGAAAGCCAGAAAGG	469 pb	0.2 mM de dNTPs, 2.5 mM de MgCl ₂ , 0,5 µM de cada cebador, 2.5 µl de ADN molde, 1.25 U de Taq Polimerasa y 1X de Buffer de la enzima	5 min a 94°C, [1 min a 94°C, 1 min a 52°C, 1 min a 72°C] x 30, extensión 10 min a 72°	Cóppola et al, 2020
	qnrB R	ACGACGCCTGGTAGTTGTCC				
<i>qnrA</i>	qnrA F	ATTTCTCACGCCAGGATTTG	516 pb		5 min a 94°C, [1 min a 94°C, 1 min a 53°C, 1 min a 72°C] x 30, extensión 10 min a 72°	
	qnrA R	GATCGGCAAAGGTTAGGTCA				
<i>qnrC</i>	qnrC F	GGGTTGTACATTTATTGAATC	307 pb	0.2 mM de dNTPs, 2.0 mM de MgCl ₂ , 0,5 µM de cada cebador, 2.5 µl de ADN molde, 1.25 U de Taq Polimerasa y 1X de Buffer de la enzima	5 min a 94°C, [1 min a 94°C, 1 min a 50°C, 1 min a 72°C] x 30, extensión 10 min a 72°	
	qnrC R	CACCTACCCATTTATTTTCA				
<i>qnrD</i>	qnrD F	CGAGATCAATTTACGGGGAATA	580 pb		5 min a 94°C, [1 min a 94°C, 1 min a 51°C, 1 min a 72°C] x 30, extensión 10 min a 72°	
	qnrD R	AACAAGCTGAAGCGCCTG				
<i>qnrS</i>	qnrS F	ACGACATTCGTCAACCTGCAA	417 pb		5 min a 94°C, [1 min a 94°C, 1 min a 53°C, 1 min a 72°C] x 30, extensión 10 min a 72°	
	qnrS R	TAAATTGGCACCCCTGTAGGC				

Tabla 5: Cebadores y condiciones de PCR utilizados para la determinación de resistencia a fosfomicina.

Genes	Cebador	Secuencia (5'--3')	Tamaño (pb)	Mezcla de reacción	Ciclado	Referencia				
<i>fosA</i>	fosA F	ATCTGTGGGTCTGCCTGTCGT	271	0.2 mM de dNTPs, 2.0 mM de MgCl ₂ , 0,5 μM de cada cebador, 2.5 μl de ADN molde, 1.25 U de Taq Polimerasa y 1X de Buffer de la enzima	5 min a 94°C, [1 min a 94°C, 1 min a 56°C, 1 min a 72°C] x 30, extensión 10 min a 72°	Hou 2011 y García-Fulgueiras 2019				
	fosA R	ATGCCCCGCATAGGGCTTCT								
<i>fosB</i>	fosB F	AATCGGATTTTAGTGTGGAAACA	420		0.2 mM de dNTPs, 2.0 mM de MgCl ₂ , 0,5 μM de cada cebador, 2.5 μl de ADN molde, 1.25 U de Taq Polimerasa y 1X de Buffer de la enzima	5 min a 94°C, [1 min a 94°C, 1 min a 58°C, 1 min a 72°C] x 30, extensión 10 min a 72°	Xu 2013			
	fosB R	GGGTAATCGGATAATAGTGTGGA								
<i>fomA</i>	fomA F	GGGGGATCCACGCCCGATTTCTTGGCC	795			0.2 mM de dNTPs, 2.0 mM de MgCl ₂ , 0,5 μM de cada cebador, 2.5 μl de ADN molde, 1.25 U de Taq Polimerasa y 1X de Buffer de la enzima	5 min a 94°C, [1 min a 94°C, 1 min a 60°C, 1 min a 72°C] x 30, extensión 10 min a 72°	Kobayashi 2000		
	fomA R	GGGGGATCCCGCAGAAGCAGTCGTGGTG								
<i>fomB</i>	fomB R	GGGGGATCCCTGGAAAACCTCACGATCCGC	991				0.2 mM de dNTPs, 2.0 mM de MgCl ₂ , 0,5 μM de cada cebador, 2.5 μl de ADN molde, 1.25 U de Taq Polimerasa y 1X de Buffer de la enzima	5 min a 94°C, [1 min a 94°C, 1 min a 60°C, 1 min a 72°C] x 30, extensión 10 min a 72°	Kobayashi 2000	
	fomB R	GGGGGATCCTTCGGCAAGCTGCTTGAGCGTC								
<i>fosA3</i>	fosA3 F	TGAATCATCTGACGCTGG	404					0.2 mM de dNTPs, 2.0 mM de MgCl ₂ , 0,5 μM de cada cebador, 2.5 μl de ADN molde, 1.25 U de Taq Polimerasa y 1X de Buffer de la enzima	5 min a 94°C, [1 min a 94°C, 1 min a 45°C, 1 min a 72°C] x 30, extensión 10 min a 72°	García-Fulgueiras 2019
	fosA3 R	TCAATCAAAAAAGACCATC								
<i>fosC2</i>	fosC2 F	CGTTCCGTGGAGTTCTATAC	334	0.2 mM de dNTPs, 2.0 mM de MgCl ₂ , 0,5 μM de cada cebador, 2.5 μl de ADN molde, 1.25 U de Taq Polimerasa y 1X de Buffer de la enzima					5 min a 94°C, [1 min a 94°C, 1 min a 54°C, 1 min a 72°C] x 30, extensión 10 min a 72°	Nakamura 2014
	fosC2 R	CTTGATAGGGTTTAGACTTC								
<i>fosA7</i>	fosA7 F	ATGCTTCAATCTCTGAACCAC	409		0.2 mM de dNTPs, 2.0 mM de MgCl ₂ , 0,5 μM de cada cebador, 2.5 μl de ADN molde, 1.25 U de Taq Polimerasa y 1X de Buffer de la enzima				5 min a 94°C, [1 min a 94°C, 1 min a 56°C, 1 min a 72°C] x 30, extensión 10 min a 72°	Estos cebadores fueron diseñados en el Laboratorio de Resistencia a antibióticos por Vignoli R 2020
	fosA7R	CCGAAACGCATTCCAGAGTA								

4 Resultados

4.1 PCR cuádruple

Se puso a punto la técnica de PCR cuádruple a tiempo final para la amplificación de los genes *chuA*, *yjaA*, *tspE4.C2* y *arpA* y la PCR de confirmación de los grupos C y E de acuerdo con lo propuesto por Clermont y colaboradores (2013). Los cebadores y las condiciones de PCR utilizados para la determinación de los distintos grupos filogenéticos se detallan en la Tabla 3.

En la figura 5 se muestran los resultados de los amplicones obtenidos a partir de la PCR cuádruple.

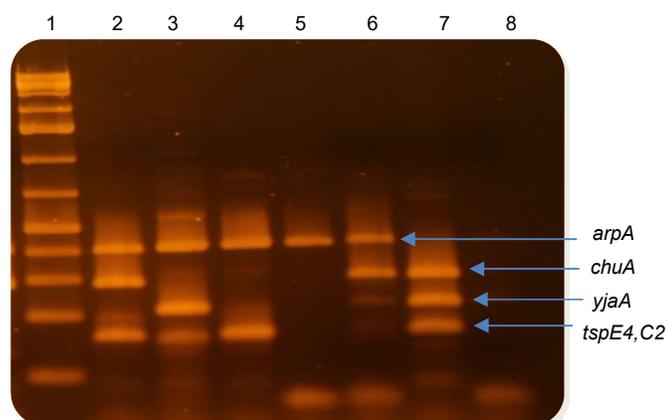


Figura 5. PCR cuádruple para los genes *chuA*, *yjaA*, *tspE4.C2*, *arpA*. Pocillo 1: Marcador de tamaño molecular 1KbPlus (Thermo), Pocillo 2 – 4: muestras problema, Pocillo 5: control positivo gen *arpA*, Pocillo 6: control positivo gen *arpA* y *chuA*, Pocillo 7: control positivo *chuA*, *yjaA* y *tspE4.C2*, 8: control negativo para todos los genes.

Los amplicones obtenidos para los genes *chuA*, *yjaA*, *tspE4.C2*, *arpA* (de grupo A y E) y *trpA* (de grupo C) se secuenciaron en el servicio de MACROGEN (Fig. 6) y las secuencias consenso generadas se compararon con secuencias de referencia publicadas en la base de datos del NCBI, confirmándose la identidad de cada uno de los genes (Fig. 7).

60 70 80 90 100 110 120 130
ACACAT T G C T G C A C A A T A T A T T A A T G A T A T T T A T C A G A A T G T T G A C T A C A A A C C C C A T C A A G A T G A T T A C T C T T C A G C T G A A A A A T

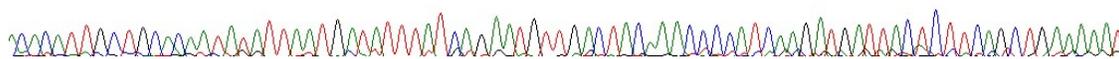


Figura 6. Resultado ilustrativo de uno de los cromatogramas obtenidos de la secuenciación del amplicón del gen *arpAgpE*, analizado con el programa BioEdit (versión 7.5.0.3).

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
510 bits(276)	1e-140	276/276(100%)	0/276(0%)	Plus/Plus

Features: [bifunctional isocitrate dehydrogenase kinase/phosphatase](#)

```

Query 1 CCGTCACGGGCGTGTGGTTTTTTTATGATTACGATGAAATTTGCTACATGACGGAAGTGAA 60
Sbjct 5122920 CCGTCACGGGCGTGTGGTTTTTTTATGATTACGATGAAATTTGCTACATGACGGAAGTGAA 5122979

Query 61 TTTCCGCGATATCCCGCCGCGCTACCCGGAAGACGAACTTGCCAGCGAACCGTGGTA 120
Sbjct 5122980 TTTCCGCGATATCCCGCCGCGCTACCCGGAAGACGAACTTGCCAGCGAACCGTGGTA 5123039

Query 121 CAGCGTCTCGCCGGGCGATGTTTTCCCGGAAGAGTTTCGCCATTGGCTATGCGCCGACCC 180
Sbjct 5123040 CAGCGTCTCGCCGGGCGATGTTTTCCCGGAAGAGTTTCGCCATTGGCTATGCGCCGACCC 5123099

Query 181 GCGTATTGGTCCGCTGTTTTGAAGAGATGCACGCCGACCTGTTCCGCGCTGATTACTGGCG 240
Sbjct 5123100 GCGTATTGGTCCGCTGTTTTGAAGAGATGCACGCCGACCTGTTCCGCGCTGATTACTGGCG 5123159

Query 241 CGCACTACAAAACCGCATACGTGAAGGGCATGTGGA 276
Sbjct 5123160 CGCACTACAAAACCGCATACGTGAAGGGCATGTGGA 5123195

```

Figura 7. Ejemplo de porcentaje de identidad entre la secuencia obtenida para el amplicón de *arpA* y la secuencia de la *E. coli* O157:H7 FRIK804. Herramienta: BLAST.

4.2 Asignación de grupo filogenético

La totalidad de los aislamientos fueron asignados a un grupo filogenético, encontrándose representados en la muestra los filogrupos A, B1, C, E y F. El grupo B1 fue el más representado entre los aislamientos STEC ($n=9$). El resto de los 20 aislamientos analizados se asignaron de la siguiente manera: 6 se asignaron al grupo E, 2 fueron asignados al grupo A, 2 al grupo C y 1 al grupo F. Respecto a los aislamientos y los animales, se encontraron aislamientos de distintos animales con el mismo filogrupo y también aislamientos de un mismo animal con filogrupos diferentes. En la Tabla 6 se muestran los resultados obtenidos por aislamientos estudiados.

Los 2 aislamientos asignados al filogrupo A (aislamientos 3 y 4) presentaron el mismo genotipo (*arpA+*). Estos aislamientos tienen procedencias distintas y diferencias en los genes de virulencia *stx*, siendo además el aislamiento 3 un aislamiento obtenido de una muestra de intestino de un caso de mortalidad por DNT y el aislamiento 4 obtenido de heces de un ternero con síntomas de DNT, pero sin mortalidad al momento de toma de la muestra (Tabla 6).

Tabla 6: Genotipos obtenidos y filogrupos asignados para todos los aislamientos de STEC

Aislamiento	Animal	Genes					Filogrupo	
		<i>arpA</i>	<i>chuA</i>	<i>yjaA</i>	<i>tspE4.C2</i>	<i>arpAgpE</i>		<i>trpAgpC</i>
1 (74.1)	1	X			X		B1	
2 (74.2)		X			X		B1	
3 (16.16)	2	X					A	
4 (AG2.1)	3	X					A	
5 (AD 1.2)	4	X	X			X	E	
6 (AD1.5)		X	X			X	E	
7 (AD1.6)				X				F
8 (AD1.7)		X			X			B1
9 (AD1.9)		X	X	X		X		E
10 (AD3.2)		X			X			B1
11 (AD 3.9)	5	X	X		X	X	E	
12 (AD7.2)	6	X			X		B1	
13 (AD 7.4)		X		X			X	C
14 (AD7.5)		X		X			X	C
15 (AD7.10)		X		X	X	X		E
16 (AC3.1)	7	X			X		B1	
17 (AC3.10)		X			X			B1
18 (BJ1.3)	8	X	X		X	X	E	
19 (BJ1.5)		X			X			B1
20 (BJ1.10)		X			X			B1

En el caso de los aislamientos asignados al filogrupo E, se encontraron 3 genotipos distintos (*arpA+/chuA+*, *arpA+/chuA+/yja+*, *arpA+/chuA+/tspE4.C2+*). Estos aislamientos tienen representantes de distintos serogrupos, aunque la mayoría no tiene serogrupo determinado. Sólo el aislamiento 9 fue identificado como O111 y el aislamiento 18 como O103. Si bien se encontró que todos estos aislamientos presentan *stx1*, dos de ellos tenían el subtipo a+c mientras el resto presentó el subtipo a (Tabla 7).

Tabla 7: Subtipificación STEC-LEE +, serogrupo, genotipo obtenido y filogrupo asignados para todos los aislamientos de STEC

Aislamiento	Subtipificación STEC-LEE +				Serogrupo (PCR)	Genotipo	Filogrupo	
	stx1		stx2					eae
	a	a+c	a	e				
1 (74.1)	X				X	O111	<i>arpA / tspE4.C2</i>	B1
2 (74.2)	X				X	O111	<i>arpA / tspE4.C2</i>	B1
3 (16.16)		X			X	O111	<i>arpA</i>	A
4 (AG2.1)			X		X	n/d	<i>arpA / chuA / tspE4.C2</i>	A
5 (AD 1.2)	X				X	n/d	<i>arpA / tspE4.C2</i>	E
6 (AD1.5)		X			X	n/d	<i>arpA / tspE4.C2</i>	E
7 (AD1.6)	X				X	n/d	<i>chuA</i>	F
8 (AD1.7)		X			X	O111	<i>arpA / tspE4.C2</i>	B1
9 (AD1.9)		X			X	n/d	<i>arpA / chuA / yjaA / arpAgpE</i>	E
10 (AD3.2)		X			X	O111	<i>arpA / tspE4.C2</i>	B1
11 (AD 3.9)	X				X	O111	<i>arpA / chuA / tspE4.C2 / arpAgpE</i>	E
12 (AD7.2)	X				X	n/d	<i>arpA / tspE4.C2</i>	B1
13 (AD 7.4)	X				X	O111	<i>arpA / yjaA / trpAgpC</i>	C
14 (AD7.5)	X				X	n/d	<i>arpA / yjaA / trpAgpC</i>	C
15 (AD7.10)	X				X	O111	<i>arpA / yjaA / tspE4.c2 / arpAgpE</i>	E
16 (AC3.1)		X			X	n/d	<i>arpA / tspE4.c2</i>	B1
17 (AC3.10)	X				X	O103	<i>arpA / tspE4.c2</i>	B1
18 (BJ1.3)	X			X	X	O103	<i>arpA / chuA / tspE4.C2 / arpAgpE</i>	E
19 (BJ1.5)		X		X	X	O103	<i>arpA / tspE4.C2</i>	B1
20 (BJ1.10)	X			X	X	O103	<i>arpA / tspE4.C2</i>	B1

4.3 Resistencia a antibióticos

4.3.1 Estudios de susceptibilidad antibiótica

Mediante el método de disco difusión de Kirby-Bauer se determinó la susceptibilidad antibiótica de los distintos aislamientos de STEC (Fig. 8).

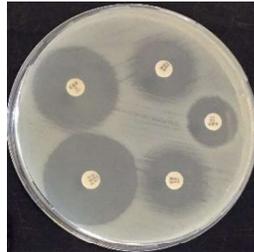


Figura 8. Antibiograma por disco-difusión. Se observan los halos de inhibición de 5 de los antibióticos testados para una de las cepas problema.

En la Tabla 8 se presentan los diámetros correspondientes a los halos de inhibición obtenidos a partir de los antibiogramas que se realizaron para cada aislamiento de STEC de manera individual.

Tabla 8. Halos de inhibición antibiótica (mm) observados (puntos de corte definidos por EUCAST, VET08).

Aislamiento	Antibiótico									
	AMP	CXM	CAZ	NA	CIP	ENR	AK	CN	SXT	FOT
1 (74.1)	17*	22*	30	24	30	28	21	20	29	33
2 (74.2)	17*	24	32	24	33	28	22	19	30	29
3 (16.16)	6	22*	30	26	31	33	25	8	25	17
4 (AG2.1)	25	24	35	28	38	30	22	22	31	20
5 (AD 1.2)	17*	20*	29	23	30	25	20	20	29	25
6 (AD1.5)	15*	18*	28	20	28	23	20	18	27	24
7 (AD1.6)	14*	20*	27	23	28	24	19	19	26	24
8 (AD1.7)	6	22*	30	23	35	31	21	18	20	30
9 (AD1.9)	6	22*	30	25	36	32	23	20	24	34
10 (AD3.2)	6	24	30	23	36	33	22	20	23	29
11 (AD 3.9)	14*	23	28	15*	24*	22*	23	20	29	33
12 (AD7.2)	6	22*	30	23	35	31	21	20	23	30
13 (AD 7.4)	19	23	27	23	30	32	21	20	29	34
14 (AD7.5)	16*	20*	28	23	30	27	22	22	28	27
15 (AD7.10)	17*	22*	28	24	30	28	20	21	28	33
16 (AC3.1)	17*	20*	28	21	30	30	23	20	29	33
17 (AC3.10)	19	23	27	22	34	29	21	20	28	33
18 (BJ1.3)	20	23	31	26	33	30	21	19	26	31
19 (BJ1.5)	16*	20*	28	23	35	29	22	22	29	32
20 (BJ1.10)	14*	24	32	25	36	30	23	19	34	30

AMP, Ampicilina; CXM, Cefuroxime; CAZ, Ceftazidime; NA, Acido Nalidíxico; CIP, Ciprofloxacina; ENR, Enrofloxacina; AK, Amikacina; CN, Gentamicina; SXT, Trimetoprim-sulfametoxazol; FOT, Fosfomicina. Se marcan en sombreado y con asteriscos los valores pertenecientes a la categoría de resistentes y sensibilidad intermedia, respectivamente.

En la Fig. 9 se muestra los niveles de sensibilidad a los distintos antibióticos utilizados. Los mayores niveles de resistencia y susceptibilidad intermedia se observaron para ampicilina (80%) seguido de cefuroxime (60%). Solo uno mostró multiresistencia evidente (AMP, CN y FOT). Un aislamiento presentó resistencia intermedia a las tres quinolonas estudiadas. Por otro lado, todos los aislamientos presentaron sensibilidad a ceftazidime, amikacina y trimetoprim-sulfametoxazol (Fig. 9)

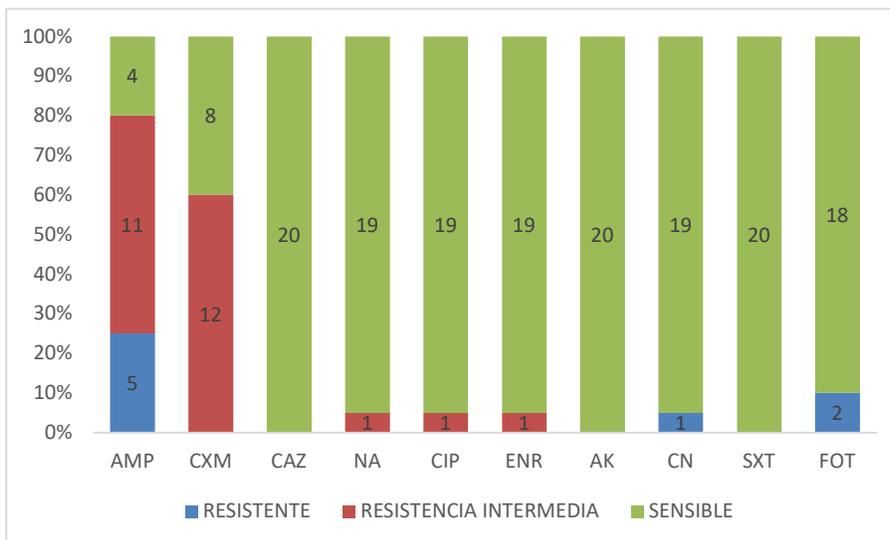


Figura 9. Porcentajes la resistencia o sensibilidad antibiótica de los aislamientos de STEC. En cada barra se indica el número de aislamientos resistentes o sensibles a cada antibiótico.

4.3.2 Búsqueda de mecanismos de resistencia a fluoroquinolonas y fosfomicina

Dado la presentación de resistencias intermedias en el aislamiento AD3.9, se realizó la búsqueda de mecanismos de resistencia transferible a fluoroquinolonas, como ser los genes *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrE*, *qnrVC* y *qnrS*. El aislamiento AD3.9 fue negativo para todos los genes de resistencia a fluoroquinolonas testeados.

Por otro lado, los aislamientos 16.16 y AG2.1 se consideraron resistentes a fosfomicina. El punto de corte de EUCAST para dicho antibiótico indica que los aislamientos con un halo <24mm son resistentes. Debido a esto, llevamos a cabo la búsqueda de genes de resistencia a fosfomicina (*fosA*, *fosB*, *fomA*, *fomB*, *fosA3*, *fosC2* y *fosA7*), siendo sólo el aislamiento 16.16 positivo para *fosA7* (Fig. 10).

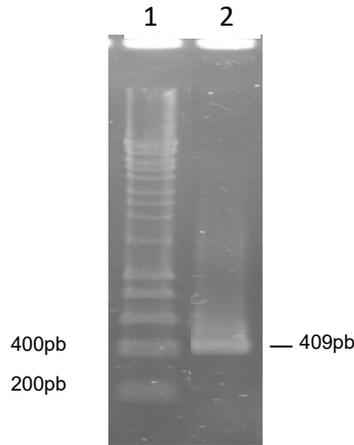


Figura 10. PCR para *fosA7*. Carril 1, marcador de peso molecular Hyper Ladder 1kb; carril 2, aislamiento 16.16. La flecha indica el amplicón obtenido para el aislamiento 3 (16.16).

4.3.3 Confirmación de la identidad del gen *fosA7*

La secuenciación del amplicón *fosA7* del aislamiento 16.16, reveló una identidad del 100% con respecto al gen *fosA7* de la secuencia de *E. coli* 210205630 (NG_067231.1) (Fig. 11).

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
752 bits(407)	0.0	407/407(100%)	0/407(0%)	Plus/Plus
Query 1	ATGCTTCAATCTCTGAACCACCTTAACGCTTGCTGTCAGTAATTTGCAAAGTAGCCTGACA	60		
Sbjct 101	ATGCTTCAATCTCTGAACCACCTTAACGCTTGCTGTCAGTAATTTGCAAAGTAGCCTGACA	160		
Query 61	TTCTGGCGCGATTGCTGGGGTTGCAGTTACATGCTGAGTGGGTACAGGTGCTTACCTT	120		
Sbjct 161	TTCTGGCGCGATTGCTGGGGTTGCAGTTACATGCTGAGTGGGTACAGGTGCTTACCTT	220		
Query 121	ACCTGTGGTGACCTTTGGCTCTGTCTTTCTTATGACGTATCCCGTAGCTACGTGGCCCA	180		
Sbjct 221	ACCTGTGGTGACCTTTGGCTCTGTCTTTCTTATGACGTATCCCGTAGCTACGTGGCCCA	280		
Query 181	CAGAAAAGTGACTATACCCATTACGCATTACGATTGCGCCAGAAGATTTGAGCCGTTC	240		
Sbjct 281	CAGAAAAGTGACTATACCCATTACGCATTACGATTGCGCCAGAAGATTTGAGCCGTTC	340		
Query 241	TCATATAAGCTGAAACAGTCGGGAGTGACGGTCTGGAAAGACAATAAAAGCGAAGGGCAA	300		
Sbjct 341	TCATATAAGCTGAAACAGTCGGGAGTGACGGTCTGGAAAGACAATAAAAGCGAAGGGCAA	400		
Query 301	TCTTCTATTTTCTTGACCCGGATGGCCACAAGCTGGAGCTGCATGTGGGAGATTTAGCA	360		
Sbjct 401	TCTTCTATTTTCTTGACCCGGATGGCCACAAGCTGGAGCTGCATGTGGGAGATTTAGCA	460		
Query 361	TCTCGACTGGCGCAGTGCCGGGAGAGGCCCTTACTCTGGAATGCGTTT	407		
Sbjct 461	TCTCGACTGGCGCAGTGCCGGGAGAGGCCCTTACTCTGGAATGCGTTT	507		

Figura 11. Alineamiento de la secuencia obtenida para el amplicón de *fosA7* del aislamiento 16.16 y la secuencia de la cepa de referencia *E. coli* 210205630. Herramienta: BLAST.

5 Discusión

En nuestro país se observa desde hace unos años una tendencia a la disminución del área destinada a la cría de ganado de carne y de lechería, lo que paulatinamente está llevando a la intensificación de los sistemas de producción animal (Anuario de la Dirección de Estadísticas Agropecuarias DIEA, 2019). En estas situaciones se genera una difusión de microorganismos, capaces de generar enfermedades infectocontagiosas, más rápida que la que se observa en sistemas extensivos tradicionales (Odeón et al, 2001). La DNT es una de las dos enfermedades infectocontagiosas más frecuentes a nivel mundial en terneros (Lorenz et al, 2011; 2015; Kolenda et al, 2015), y *E. coli* es uno de los 5 agentes infecciosos más comúnmente asociados a la enfermedad (Kirisawa et al, 2007; Foster y Smith, 2009).

Si bien *E. coli* forma parte de la microbiota del intestino de los humanos saludables, así como de otros mamíferos y aves y no causa daño, en ciertas circunstancias es capaz de causar enfermedad (Russo et al, 2000; Gyles et al, 2010). Un gran número de clones de *E. coli* han adquirido atributos de virulencia específicos que les permite causar un amplio espectro de enfermedades, entre las que se incluyen enfermedad diarreica entérica, infecciones del tracto urinario y sepsis/meningitis (Kaper y O'Brien, 2014). Dentro del grupo de *E. coli* diarreogénicas (DEC), las cepas STEC son altamente patogénicas para los seres humanos, siendo causante de enfermedades como la CH y el SUH (Lukjancenko et al, 2010; Kaper y O'Brien, 2014). Además, existen reportes de casos de diarrea en terneros jóvenes debidos a STEC (Mainil y Fairbrother, 2014). Los bovinos y otros rumiantes son el principal reservorio de las cepas STEC (Gyles et al, 2010) y su propagación puede producirse a través de la ruta fecal-oral, ya sea directamente a través del contacto con heces de animales colonizados, o indirectamente a través de alimentos y agua contaminados (Caprioli et al, 2005; Daly et al, 2016).

Para poder estudiar la epidemiología y comprender la especialización de nicho que tiene *E. coli*, tanto las comensales como las causantes de enfermedad en los seres humanos y en los animales, resulta esencial estudiar la ecología, la adaptación a los nichos que coloniza y la diversidad genética (Clermont et al, 2008). Las técnicas de biología molecular como la PCR son una herramienta muy utilizada visto que permiten entre otras cosas detectar diferentes genes de virulencia, a partir de lo que se clasifican las variantes de *E. coli* en virotipos. Asimismo, si se estudia la estructura poblacional de este microorganismo se observa que es mayoritariamente clonal, describiéndose actualmente 8 grupos filogenéticos de *E. coli* (A, B1, B2, C, D, E, F y clado I (Touchon et al, 2009; Clermont et al, 2013). Las cepas de *E. coli* de origen animal (incluyendo estas cepas patógenas para humanos) no son fácilmente distinguibles de las cepas ambientales a nivel fenotípico (Jang et al, 2017).

La determinación de dichos filogrupos se ha propuesto como una herramienta simple para asociar las cepas de *E. coli* a su fuente de origen. Clermont y colaboradores desarrollaron en 2013 un método que permite asignar de forma rápida y sencilla el grupo filogenético a una determinada cepa de *E. coli* mediante una PCR cuádruple a tiempo final. Con la finalidad de determinar los grupos filogenéticos de una colección de aislamientos de STEC aisladas de terneros, en este trabajo se puso a punto la técnica de PCR cuádruple a tiempo final, para la amplificación de los genes *chuA*, *yjaA*, *tspE4.C2* y *arpA* de *E. coli*, mencionada anteriormente. Se modificaron las condiciones del ciclado y la mezcla de reacción, y los amplicones obtenidos se confirmaron mediante secuenciación y análisis bioinformáticos. Una vez que se contó con el PCR cuádruple, se asignaron los filogrupos. El grupo B1 fue el más representado entre los aislamientos STEC. Además, se observó la ocurrencia de más de un filogrupo por animal. El grupo con mayor representación fue el B1 con un 48% de las muestras, lo cual coincide con Russo y colaboradores (2000) y Pupo y colaboradores (1997), quienes proponen que los patotipos diarreogénicos del grupo DEC derivan de los filogrupos A, B1 ó D. Estudios de secuenciación genómica han demostrado también que el filogrupo B1 agrupa a la mayoría de las cepas STEC no-O157, como las que se utilizaron en este trabajo, exceptuando al serogrupo O145 (Denamur et al, 2020). El hecho de que no se encontraran aislamientos pertenecientes al grupo D y que el grupo A no tuviera una representación mayor a los demás podría explicarse por un número bajo de muestras. Este resultado también concuerda con el hallazgo de Morcatti Coura y colaboradores (2015), quien propone que los filogrupos B1 y E están mayormente asociados a *E. coli* aisladas de ganado. No se encontró relación entre los aislamientos que pertenecieron a un mismo grupo filogenético y el serogrupo o el perfil de genes de virulencia *stx*. Si bien Johnson y colaboradores (2002) encontraron que las cepas pertenecientes a los filogrupos B2 y D contenían mayor cantidad de factores de virulencia que las de los filogrupos A y B1, no fue posible sacar conclusiones al respecto por las características y bajo número de los aislamientos analizados en este trabajo. Por otro lado, en este trabajo pudimos determinar que en las heces de terneros coexisten aislamientos de STEC con diferente parentesco, pertenecientes a distintos grupos filogenéticos, situación que era previsible si se tiene en cuenta la gran diversidad y variantes patogénicas descritas de este microorganismo (Gyles et al, 2010).

Paralelamente a los ensayos de asignación de filogrupo se realizó la caracterización de la resistencia a antibióticos y la búsqueda de mecanismos de resistencia transferibles a fluoroquinolonas y fosfomicina. Se determinó un alto porcentaje de resistencia a ampicilina y cefuroxime. El alto porcentaje de aislamientos resistentes a ampicilina concuerda con el hecho de que los β -lactámicos, junto a las fluoroquinolonas, son algunos de los antibióticos más utilizados en los animales (Constable et al, 2004).

Dado los perfiles de resistencia a los β -lactámicos (resistencia/ resistencia intermedia solamente a ampicilina y cefuroxime) podemos decir que nos encontramos frente a una β -lactamasa de espectro ampliado (BLEA) o hiperexpresión de AmpC en *E. coli* (Navarro et al, 2010). Las BLEA, suelen ser mecanismos de resistencia frecuente en aislamientos de *E. coli*, sin embargo, su detección no representa un “problema” ya que no confieren resistencia a β -lactámicos considerados de uso crítico por parte de la OMS, como ser cefalosporinas de tercera y cuarta generación. Por otro lado, es necesario tener presente estos mecanismos de resistencia, ya que varias de las β -lactamasas de espectro extendido derivan de modificaciones en el sitio activo de las BLEA, aumentando así su perfil de hidrólisis (Bush et al, 2010; OMS, 2017). Asimismo, *E. coli* presenta una β -lactamasa cromosómica de tipo AmpC que normalmente se expresa a muy bajos niveles sin presentar importancia clínica, sin embargo, su hiperproducción puede afectar hasta cefalosporinas de segunda y tercera generación dependiendo de los niveles de expresión (Navarro et al, 2010). De acuerdo con lo propuesto por Galarce y colaboradores (2010) la resistencia a los β -lactámicos es la más frecuente en ganado bovino y suinos en Chile, lo cual coincide con en nuestro trabajo. En dicho estudio se determinó una alta presencia de genes de resistencia a β -lactámicos, la cual en el caso de ampicilina no reflejaba la resistencia encontrada a nivel fenotípico, explicando dicha diferencia por un nivel bajo de expresión génica. Asimismo, Umpiérrez y colaboradores (2017) en un estudio realizado sobre muestras de *E. coli* de origen bovino en Uruguay determinaron la presencia de genes *bla*_{CTX-M-14} en tres aislamientos, los cuales codifican a BLEE del tipo CTX-M-14, mientras que el trabajo llevado a cabo por Cóppola y colaboradores (2020) se demostró la presencia de *E. coli* de origen bovino con BLEE del tipo CTX-M-15. En nuestro trabajo no observamos dichos mecanismos de resistencia.

Por otro lado, se observó un aislamiento con resistencia intermedia a ácido nalidíxico, ciprofloxacina y enrofloxacin. Umpiérrez y colaboradores (2017) describen en su estudio la presencia de los genes de resistencia a fluoroquinolonas *qnrS1* y *qnrB2*, siendo los primeros que describen la presencia del gen *qnrS1* en *E. coli* en el país. Además, Cóppola y colaboradores (2020) describen en animales de producción (bovinos, suinos y aves de corral) los genes *qnrB19*, *qnrE1* y *qnrS1*. En nuestro trabajo, el aislamiento que demostró resistencia a ácido nalidíxico, ciprofloxacina y enrofloxacin fue analizado para la detección de mecanismos de resistencia transferible a fluoroquinolonas, siendo negativo para todos ellos, lo que contrasta con lo observado previamente donde se observaron aislamientos de origen bovino con genes de resistencia transferibles a quinolonas (*qnrB2* y *qnrS1*) (Umpiérrez et al, 2017). Dicha resistencia puede deberse a mutaciones puntuales en las girasas. Esto podría confirmarse mediante secuenciación de los genes *gyrA* y *gyrB* para luego realizar el análisis de la región determinante de resistencia a quinolonas (QRDR). Dicha región se encuentra dentro de los genes antes mencionados y es allí donde se localizan las mutaciones que conllevan al aumento

de la resistencia a quinolonas. Estas mutaciones llevan a cambios aminoacídicos en las posiciones 83 y 87 de GyrA, el cual es el sitio de unión al ADN clivado transitoriamente. Mientras que en GyrB el cambio aminoacídico ocurre en el centro de la subunidad B de la girasa. La combinación de varias mutaciones en estas zonas y/o asociado a un gen transferible de resistencia a quinolonas, es lo que conduce a un alto nivel de resistencia a los mismos (Aldred et al, 2014). De acuerdo con trabajos realizados por Chakraborty (2015), los filogrupos A y B1 suelen presentar mayor resistencia a ciprofloxacina. En nuestro trabajo, el aislamiento que presentó resistencia intermedia a ciprofloxacina fue asignado al grupo filogenético E, no encontrándose una relación entre el grupo filogenético y la presencia de dicha resistencia.

Asimismo, se observó resistencia a fosfomicina en dos aislamientos, detectándose en uno de ellos el gen *fosA7*. La presencia de este mecanismo de resistencia representa un problema para la salud humana y animal, dada la posibilidad de transferencia de dicho mecanismo entre ambos. Particularmente, la fosfomicina es un antibiótico considerado de reserva para el uso clínico en humanos, según la lista OMS AWARE (https://who.int/medicines/news/2019/WHO_releases2019AWaRe_classification_antibiotics/en/). Este subgrupo de antibióticos debe reservarse para el tratamiento de infecciones confirmadas o sospechosas debidas a organismos multirresistentes, y ser utilizados como de "último recurso" en la salud humana. De allí la importancia de la detección de dichos mecanismos de resistencia a nivel animal, el cual puede tener un impacto de la salud humana como lo establece el concepto de "Una Salud" (<http://www.oie.int/en/for-the-media/onehealth/>).

Si bien el gen *fosA7* fue descubierto y localizado a nivel cromosómico únicamente en *Salmonella* (Rehman et al, 2017) estudios posteriores realizados en Estados Unidos determinaron su presencia en muestras de *E. coli* en un plásmido conjugativo (Balbin et al, 2020). La presencia de este gen en aislamientos provenientes de terneros y la posibilidad de transmisión de este tipo de resistencia a los seres humanos representa una posible amenaza al uso de fosfomicina como tratamiento de las infecciones urinarias, entre otras.

A partir de los resultados obtenidos, podemos afirmar que los aislamientos de STEC obtenidos de heces de terneros asociados a DNT pertenecen a diferentes grupos filogenéticos. Por otro lado, si bien se detectaron patrones de resistencia a algunos antibióticos, solo uno de los aislamientos analizados presentó un perfil de multirresistencia dado que presentó resistencia a tres familias de antimicrobianos de uso habitual en la clínica (Magiorakos et al, 2012).

6. Perspectivas

Ampliar los estudios de filogrupos a otros patotipos de *E. coli* obtenidos de casos de DNT y de mortalidad de terneros en Uruguay.

Secuenciar los genes *gyrA* y *gyrB* y analizar la región determinante de resistencia a quinolonas (QRDR).

Realizar ensayos de conjugación del gen *fosA7* entre aislamientos de *E. coli* de origen bovino y *E. coli* K12 de laboratorio.

7. Bibliografía

6ª revisión de la Lista OMS de Antimicrobianos de Importancia Crítica para la Medicina Humana.

Aldred KJ, Kerns RJ, Osheroff N (2014) Mechanism of Quinolone Action and Resistance. *Am Chem Soc.* 53:1565-1574.

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

Anuario de la Dirección de Estadísticas Agropecuarias DIEA (2019).

Balbin MM, Hulla D, Guest C, Nichols L, Dunn R, Hulla D, Thakura S (2020) Antimicrobial resistance and virulence factors profile of *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* isolated from different environments exposed to anthropogenic activity. *J Glob Antimicrob. Resist.* 22: 578–583.

Berge, ACB, Atwill ER, Sisco WM (2005) Animal and farm influences on the dynamics of antibiotic resistance in faecal *Escherichia coli* in young dairy calves. *Prev Vet Med.* 69:25–38.

Bingen E, Picard B, Brahimi N, Mathy S, Desjardins P, Elion J, Denamur E (1998) Phylogenetic analysis of *Escherichia coli* strains causing neonatal meningitis suggests horizontal gene transfer from a predominant pool of highly virulent B2 group strains. *J Infect Dis.* 177:642-650.

Blanco M, Padola ML, Krüger A, Sanz M, Blanco JE, González EA, Dahbi G, Mora A, Bernárdez MI (2004) Virulence genes and intimin types of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle and beef products in Argentina. *Int Microbiol.* 7:269-276.

Breijyeh Z, Jubeh B, Kamaran R (2020) Resistance of Gram-Negative Bacteria to Current Antibacterial Agents and Approaches to Resolve It. *Molecules* 25, 1340.

Burger B (2012) EHEC O104:H4 in Germany 2011: Large outbreak of bloody diarrhea and haemolytic uraemic syndrome by shiga-toxin producing *E. coli* via contaminated food. *IOM Improving food safety through a One Health approach.* 115-130.

Bush K, Jacoby GA (2010) Updated functional classification of β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(3):969-976.

Caffarena RD (2017) Aspectos clínicos y epidemiológicos de la diarrea neonatal en de tambos de Uruguay y su asociación con infección por *Cryptosporidium* spp. y *Escherichia coli* F5 (K99)+. TESIS DE MAESTRÍA EN SALUD ANIMAL. Facultad de Veterinaria, UdelaR.

- Caprioli A, Morabito S, Brugère H, Oswald E. (2005) Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. *Vet Res.* 2005;36: 289–311.
- Catarina A, Lopes S, Veras DL, Lima AMS, de Cássia Andrade Melo R, Ayala J (2010) *bla*_{CTX-M-2} and *bla*_{CTX-M-28} extended-spectrum β -lactamase genes and class 1 integrons in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio Janeiro.* 105(2):163.
- Chakraborty A, Saralaya V, Adhikari P, Shenoy S, Baliga S, Hegde A (2015) Characterization of *Escherichia coli* Phylogenetic Groups Associated with Extraintestinal Infections in South Indian Population. *Ann Med Health Sci Res.* 5: 241-246.
- Chantziaras I, Boyen F, Callens B, Dewulf J (2014) Correlation between veterinary antimicrobial use and antimicrobial resistance in food-producing animals: a report on seven countries. *J Antimicrob Chemother.* 69:827-834.
- Cheng G, Dong X, Wang Y, Peng D, Wang X, Hao H, Xie S, Qu W, Liu Z, Yuan Z (2014) Development of a novel genetically modified bioluminescent-bacteria-based assay for detection of fluoroquinolones in animal-derived foods. *Anal Bioanal Chem.* 406:7899-7910.
- Clermont O, Lescat M, O'Brien CL, Gordon DM, Tenaillon O, Denamur E (2008) Evidence for a human-specific *Escherichia coli* clone. *Environ Microbiol.* 10(4), 1000-1006.
- Clermont O, Christenson JK, Denamur E, Gordon DM (2013) The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environ Microbiol Rep.* 5: 58-65.
- Cóppola N, Freire B, Umpiérrez A, Cordeiro NF, Ávila P, Trenchi G, Castro G, Cassaux ML, Fraga M, Zunino P, Bado I, Vignoli R (2020) Transferable Resistance to Highest Priority Critically Important Antibiotics for Human Health in *Escherichia coli* Strains Obtained from Livestock Feces in Uruguay. *Front Vet Sci.* 7:588919.
- Constable PD (2004) Antimicrobial use in the treatment of calf diarrhea. *J Vet Intern Med.* 18:8-17.
- Croxen MA, Law RJ, Scholz R, Keeney KM, Wlodarska M, Finlay BB (2013) Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev.* 26:822-880.
- Daly RF, Hill NT. (2016) Characterizing the Role of Animal Exposures in Cryptosporidiosis and Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* Infections: South Dakota, 2012. *Zoonoses Public Health.* 63:467–476.
- De Castro Stope N, Silva JS, Carlos C, Sato MIZ, Saraiva AM, Ottoboni LMM, Torres TT (2017) Worldwide Phylogenetic Group Patterns of *Escherichia coli* from

- Commensal Human and Wastewater Treatment Plant Isolates. *Front Vet Sci.* 8:2512.
- De Rycke J, Milton A, Oswald E (1999) Necrotoxic *Escherichia coli* (NTEC): two emerging categories of human and animal pathogens. *Vet Res.* 30:221-233.
- Dean P, Kenny B (2009) The effector repertoire of enteropathogenic *E. coli*: ganging up on the host cell. *Curr Opin Microbiol.* 12:101–109.
- Denamur E, Clermont O, Bonacorsi S, Gordon, D (2020) The population genetics of pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol.* 19:37–54 (2021).
- Drlica K y Zhao X (1997) DNA Gyrase, Topoisomerase IV, and the 4-Quinolones. *Microbiol Mol Biol Rev.* 61:377–392.
- Erickson MC, Doyle MP. (2007) Food as a Vehicle for Transmission of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. *J Food Prot.* 2426–2449.
- Ernst, D (2017). Subtipificación de toxinas Shiga en STEC de origen bovino en Uruguay. Tesina para obtener el título de Licenciada en Bioquímica, Fac. de Ciencias, UdelaR. Tutor: Dra. Ana Umpiérrez, Co-tutor: Dr. Pablo Zunino.
- Fernández M, Ernst, D, Monesiglio, C, Fraga M, Umpiérrez A, Zunino P (2019) Evaluación de perfiles de virulencia de *Escherichia coli* asociada a mortalidad de terneros y diarrea neonatal en Uruguay. Póster presentado en el II Congreso Nacional de Biociencias. 17 y 18 de octubre de 2019, Radisson Victoria Plaza, Montevideo, Uruguay.
- Foster DM, Smith GW (2009) Pathophysiology of Diarrhea in Calves. *Vet. Clin. North Am. Food Anim Pract.* 25:13-36.
- French GL (2008) A review of tigecycline. *J Chemother.* Oct;20 Suppl 1:3-11.
- Galarce N, Sanchez F, Fuenzalida V, Ramos R, Escobar B, Lapierre L, Paredes-Osses E, Arriagada G, Alegría-Morán R, Lincopán N, Fuentes-Castillo D, Vera-Leiva A, González-Rocha G, Bello-Toledo H, Borie C (2020) Phenotypic and Genotypic Antimicrobial Resistance in Non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolated From Cattle and Swine in Chile. *Front Vet Sci.* 7:367.
- Galimand M, Courvalin P, Lambert T. (2003) Plasmid-mediated high-level resistance to aminoglycosides in *Enterobacteriaceae* due to 16S rRNA methylation. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47:2565-2571.
- Garcia-Fulgueiras V, Zapata Y, Papa-Ezdra R, Ávila P, Caiata L, Seija V, Rojas Rodríguez AE, Magallanes C, Márquez Villalba C, Vignoli R (2019) First characterization of *K. pneumoniae* ST11 clinical isolates harboring blaKPC-3 in Latin America. *Rev Argent Microbiol.* 52:211–216.

Gordon DM, Clermont O, Tolley H, Denamur E (2008) Assigning *Escherichia coli* strains to phylogenetic groups: multi-locus sequence typing versus the PCR triplex method. *Environ Microbiol.* 10:2484–2496.

Gyles JM, Fairbrother CL (2010) *Escherichia coli*. En: Gyles CL, Prescott JF, Songer JG, Thoen CO (eds) *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals*. 276-308.

Hakenbeck R, Grebe T, Zahner D, Stock JB (1999) Beta-lactam resistance in *Streptococcus pneumoniae*: penicillin-binding proteins and non-penicillin-binding proteins. *Mol Microbiol.* 33:673-678.

Hansen LH, Jensen LB, Sorensen HI, Sorensen SJ (2007) Substrate specificity of the OqxAB multidrug resistance pump in *Escherichia coli* and selected enteric bacteria. *J Antimicrob Chemother.* 60:145-147.

Heyderman RS, Soriani M, Hirst TM (2001) Is immune cell activation the missing link in the pathogenesis of post-diarrhoeal HUS? *Trends Microbiol.* 9:262-266.

Hou J, Huang X, Deng Y, He L, Yang T, Zeng Z, Chen Z, Liu JH (2011) Dissemination of the Fosfomycin Resistance Gene *fosA3* with CTX-M -Lactamase Genes and *rmtB* Carried on IncFII Plasmids among *Escherichia coli* Isolates from Pets in China *Antimicrob. Agents Chemother.* 2135-2138.

Jang J, Hur HG, Sadowsky MJ, Byappanahalli MN, Yan Y, Ishii S (2017) Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications-a review. *J Appl Microbiol.* 123:570-581.

Jhonson JR, Oswald E, O'Brien TT, Kuskowsky MA, Spanjaard L (2002) Phylogenetic Distribution of Virulence-Associated Genes among *Escherichia coli* Isolates Associated with Neonatal Bacterial Meningitis in The Netherlands. *J Infect Dis.* 185:774–784.

Juillot S, Romer W. (2014) Shiga Toxins. En: *Pathogenic Escherichia coli*. *Mol. Cell. Biol.* 5:79-101.

Joffré E, Sjöling A (2016) The LT1 and LT2 variants of the enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) heat-labile toxin (LT) are associated with major ETEC lineages. *Gut Microbes.* 7:75-81.

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

Kaper JB, O'Brien AD (2014) Overview and Historical Perspectives. *Microbiol Spectr.* 2: EHEC-0028-2014.

Kintz E, Brainard J, Hooper L, Hunter P. (2017) Transmission pathways for sporadic Shiga-toxin producing *E. coli* infections: A systematic review and meta-analysis. *Int J Hyg Environ Health.* 220:57–67.

- Kobayashi S, Kuzuyama T, Seto H (2000) Characterization of the *fomA* and *fomB* Gene Products from *Streptomyces wedmorensis*, Which Confer Fosfomycin Resistance on *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44:647-650.
- Kolenda R, Burdukiewicz M, Schierack P (2015) A systematic review and meta-analysis of the epidemiology of pathogenic *Escherichia coli* of calves and the role of calves as reservoirs for human pathogenic *E. coli*. *Front Cell Infect Microbiol.* 5:1-12.
- Kirisawa R, Takeyama AI, Koiwa M, Iwai H (2007) Detection of bovine Torovirus in fecal specimens of calves with diarrhea in Japan. *J Vet Med Sci.* 69:471-476.
- Lorenz I, Fagan J, More SJ (2011) Calf health from birth to weaning. II. Management of diarrhoea in pre-weaned calves. *Ir Vet J.* 64:1-9.
- Lukjancenko O, Wassenaar TM, Ussery DW (2010) Comparison of 61 sequenced *Escherichia coli* genomes. *Microb Ecol.* 60:708-720.
- Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, Harbarth S, Hindler JF, Kahlmeter G, Olsson-Liljequist B, Paterson DL, Rice LB, Stelling J, Struelens MJ, Vatopoulos A, Weber JT, Monnet DL (2012) Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect.* 18:268–281.
- Mainil JG, Fairbrother J (2014) Pathogenic *Escherichia coli* in domestic mammals and birds. En: Morabito S (ed) *Pathogenic Escherichia coli*. *Mol. Cell. Biol.* 19-44.
- Mandell (2015) Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of INFECTIOUS DISEASES.
- Margueritte J, Mattion N, Blackhall J, Fernández F, Parreño V, Vagnozzi A, Odeón A, Combessies G (2005) Diarrea neonatal en terneros de rodeos de cría: su prevención y tratamiento. www.produccion-animal.com.ar.
- Melton-Celsa AR. 2014. Shiga Toxin (Stx) Classification, Structure, and Function. *Microbiol. Spectr.* 2: EHEC–0024–2013.
- Morcatti Coura F, de Araújo Diniz S, Silva MX, Suhett Mussi JM, Minharro Barbosa S, Pereira Lage A, Heinemann MB (2015) Phylogenetic Group Determination of *Escherichia coli* Isolated from Animals Samples. *Sci World J.* 258424.
- Muniesa M, Schmidt H (2014) Shiga Toxin-encoding Phages: Multifunctional Gene Ferries. En: *Pathogenic Escherichia coli*, *Mol. Cell. Biol.* 4:57-77.
- Murray P, Rosenthal A, Pfaller A (2016) *Medical Microbiology*, 8th edition. Elsevier. Philadelphia PA, USA, Cap. 17, pp.162-170.

- Murray GM, O'Neil RG, More SJ, McElroy MC, Earley B, Cassidy JP (2016) Evolving views on bovine respiratory disease: An appraisal of selected key pathogens- Part 1. *Vet J.* 2016 Nov; 217: 95–102.
- Nagy B, Fekete PZ (1999) Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in farm animals. *Vet Res.* 30:259-284.
- Nagy B, Fekete PZ (2005) Enterotoxigenic *Escherichia coli* in veterinary medicine. *J Med Microbiol. Suppl.* 295:443–454.
- Nakamura G, Wachino J, Sato N, Kimura K, Yamada K, Jin W, Shibayama K, Yagi T, Kawamura K, Arakawa Y (2014) Practical Agar-Based Disk Potentiation Test for Detection of Fosfomycin-Nonsusceptible *Escherichia coli* Clinical Isolates Producing Glutathione S-Transferases. *J Clin Microbiol.* 52:3175-3179.
- Nataro JP, Kaper JB (1998) Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev.* 11:142-201.
- Navarro F, Miró E, Mirelis B (2010) Lectura interpretada del antibiograma de enterobacterias. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 28:638–645.
- Nawar HF, King-Lyons ND, Hu JC, Pasek RC, Connell TD (2010) LT-IIc, a New Member of the Type II Heat-Labile Enterotoxin Family Encoded by an *Escherichia coli* Strain Obtained from a Nonmammalian Host. *Infect Immun.* 78:4705-4713.
- Nguyen TD, Vo TT, Vu-Khac H (2011) Virulence factors in *Escherichia coli* isolated from calves with diarrhea in Vietnam. *J Vet Sci.* 12:159-164.
- Odeón AC (2001) Diarrea neonatal de los terneros; etiopatogenia, tratamiento y control. *Sitio Argentino de Producción Animal* 1:1-5.
- Oliphant CM (2002) Quinolones: A Comprehensive Review. *Am. Fam. Physician, Clinical Pharmacology* Vol 65, N° 3.
- Pacheco A, Sperandio V (2012) Shiga toxin in enterohemorrhagic *E. coli*: regulation and novel anti-virulence strategies *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2:81.
- Park CH, Robicsek A, Jacoby GA, Sahm D, Hooper DC (2006) Prevalence in the United States of *aac(6)-Ib-cr* encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme. *Antimicrob Agents Chemother.* 50:3953-3955.
- Pérez L, Apezteguia L, Pineyrua C, Dabezies A, Bianco MN, Schelotto F, Varela G (2014) Hemolytic uremic syndrome with mild renal involvement due to Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) O145 strain. *Rev Argent Microbiol.* 46:103-106.
- Phillips I, Casewell M, Cox T, De Groot B, Friis C, Jones R, Nightingale C, Preston R, Waddell J (2003) Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. *J Antimicrob Chemother.* 53:28-52.

- Probert W, McQuaid C, Schrader K (2014) Isolation and Identification of an *Enterobacter cloacae* Strain Producing a Novel Subtype of Shiga Toxin Type 1. *J Clin Microbiol.* 52:2346-2351.
- Pupo GM, Karaolis DKR, Lan R, Reeves PR (1997) Evolutionary Relationships among Pathogenic and Nonpathogenic *Escherichia coli* Strains Inferred from Multilocus Enzyme Electrophoresis and *mdh* Sequence Studies. *Infect Immun.* 65:2685-2692.
- Radosttits O, Gay CC, Hinchcliff K, Constable PD (2017) Diseases associates 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. 847-896.
- Ramírez MS, Tolmasky ME (2010) Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resist Updat.* 2010;13:151-171.
- Rangel JM, Sparling PH, Crowe C, Griffin PM, Swerdlow DL (2005) Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks, United States, 1998-2002. *Emerg Infect Dis.* 1: 603-609.
- Rehman MA, Yin X, Persaud-Lachhman MG, Diarra MS (2017) First Detection of a Fosfomycin Resistance Gene, *fosA7*, in *Salmonella enterica* Serovar Heidelberg Isolated from Broiler Chickens. *Antimicrob Agents Chemother.* 61:e00410-17.
- Robicsek A, Jacoby GA, Hooper DC. (2006) The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Lancet Infect Dis.* 6:629-640.
- Rodríguez-Martínez JM, Machuca J, Eliecer M. (2016) Plasmid-mediated quinolone resistance: Two decades on. *Drug Resist Updat.* 29:13-29.
- Russo TA, Johnson JR (2000) Proposal for a New Inclusive Designation for Extraintestinal Pathogenic Isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *J Infect Dis* 181:1753-1754.
- Rycke J, Milon A, Oswald E (1999) Necrotoxic *Escherichia coli* (NTEC): Two emerging categories of human and animal pathogens. *Vet Research* 30:221-233.
- Sandvig K, van Deurs B (2002) Membrane traYc exploited by protein toxins. *Ann Rev Cell Dev Biol* 18:1–14.
- Scheutz F (2014) Taxonomy meets public health: the case of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Microbiol. Spectr.* 2:EHEC-0019-2013.
- Schmidt MA (2010) LEEways: tales of EPEC, ATEC and EHEC. *Cell Microbiol.* 12: 1544-1552.

- Shrivastava S, Shrivastava P, Ramasamy J (2018) World health organization releases global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. *J Med Soc.* 2018:76.
- Suh JK, Hovde CJ, Robertus JD (1998). Shiga toxin attacks bacterial ribosomes as effectively as eukaryotic ribosomes. *Biochem.* 37:9394-9398.
- Tenover FC (2006) Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria. *Am J Infect Control.* 119:3-10.
- Terajima J, Iyoda S, Ohnishi M, Watanabe H (2014) Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* in Japan. *Microbiol Spectr.* 2:EHEC-0011-2013.
- Touchon M, Hoede C, Tenaillon O, Barbe V, Baeriswyl S, Bidet P, Bingen E, Bonacorsi S, Bouchier C, Bouvet O, *et al* (2009) Organised genome dynamics in the *Escherichia coli* species results in highly diverse adaptive paths. *PLoS Genet.* 5, e1000344.
- Tozzoli R, Scheutz F (2014) Diarrhoeagenic *Escherichia coli* infection in humans. En: *Pathogenic Escherichia coli.* *Mol Cell Biol.* 1-18.
- Umpiérrez A, Acquistapace S, Fernández S, Oliver M, Acuña P, Reolón E, Zunino P (2016) Prevalence of *Escherichia coli* adhesion-related genes in Neonatal Calf Diarrhoea in Uruguay. *J Infect Dev Ctries.* 10:472-477.
- Umpiérrez A, Bado I, Oliver M, Acquistapace S, Etcheverría A, Padola NL, Vignoli R, Zunino P (2017) Zoonotic potential and antibiotic resistance of *Escherichia coli* in Neonatal Calves in Uruguay. *Microbes Environ.* 32:275-282.
- Umpiérrez A, Ernst D, Fernández M, Oliver M, Casaux ML, Caffarena RD, Schild C, Giannitti F, Fraga M, Zunino P (2020) Virulence genes of *Escherichia coli* in diarrheic and healthy calves. *Rev Argent Microbiol.* S0325-7541(20)30028-6.
- Vila J, Marco F (2010) Lectura interpretada del antibiograma de bacilos gramnegativos no fermentadores. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 28:726-736.
- Von Gasser C, Gautier E, Steck A, Siebenmann R E, Oechslin R (1955) Hamolytisch-uramische syndrome: bilaterale nierenrindennekrosen bei akuten erworbenen hamolytischen anamien. *Schweizerische Medizinische Wochenschrift* 85:905-909.
- Vignoli R (2019) Resistencia a Antibióticos β -lactámicos en Bacilos Gram negativos. Curso online "Microbiología Clínica: desde el laboratorio al manejo del paciente". Sección I, 34-59.
- Xu X, Chen C, Lin D, Guo Q, Hu F, et al. (2013) The Fosfomycin Resistance Gene fosB3 Is Located on a Transferable, Extrachromosomal Circular Intermediate in Clinical *Enterococcus faecium* Isolates. *PLoS ONE* 8: e78106.

Yamane K, Wachino J-i, Suzuki S, Kimura K, Shibata N, Kato H, Shibayama K, Konda T, Arakawa Y (2007) New Plasmid-Mediated Fluoroquinolone Efflux Pump, QepA, Found in an *Escherichia coli* Clinical Isolate. *Antimicrob Agents Chemother.* 51:3354-3360.

Yang X, Bai X, Zhang J, Sun H, Fu S, Fan R, He X, Scheutz F, Matussek A, Xion Y (2020) *Escherichia coli* strains producing a novel Shiga toxin 2 subtype circulate in China. *Int J Med Microbiol.* 310:151377.

https://www.who.int/foodsafety/publications/cia_guidelines/es/ Curso online "Interpretación del Antibiograma en la práctica clínica diaria" 2016. https://www.who.int/medicines/news/2019/WHO_releases2019AWaRe_classification_antibiotics/en/.