



Informe de Tesis

Doctorado en Biotecnología

Facultad de Ciencias – Instituto de Higiene – Facultad de Medicina

Universidad de la República

CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y GENOTÍPICA DE CEPAS DE ESCHERICHIA COLI PRODUCTORAS DE TOXINA SHIGA (O157 Y NO-O157) PROVENIENTES DE ALIMENTOS, GANADO Y CASOS CLÍNICOS. IDENTIFICACIÓN DE NUEVOS BLANCOS ÚTILES PARA SU DETECCIÓN Y CONTROL

Sylvia Vázquez Zeballos

Licenciada en Bioquímica

Magister en Biotecnología

Octubre 2020

Director de Tesis y Académico

Dr. Gustavo Varela

Departamento de Bacteriología y Virología – Instituto de Higiene
Facultad de Medicina

Codirector de Tesis

Dr. Andrés Iriarte

Departamento de Desarrollo Biotecnológico - Instituto de Higiene
Facultad de Medicina

Asesor estadístico

Dr. Walter Norbis

Departamento de Biología Animal - Instituto de Biología
Facultad de Ciencias-UdelaR



Contenido

Dedicatoria.....	7
Agradecimientos.....	8
Resumen	10
Introducción.....	14
Generalidades de <i>Escherichia coli</i>	14
<i>Escherichia coli</i> productor de toxina Shiga (STEC).....	15
Mecanismo de acción de la toxina Shiga	17
Variantes de toxina Shiga.....	19
Factores de virulencia adicionales de STEC	20
Gen <i>eae</i> codificador de intimina y factores de virulencia adicionales.....	20
Otros genes de virulencia descritos.....	25
STEC O157 vs. no-O157.....	26
STEC y su capacidad de producir enfermedad.....	28
Evolución cronológica de la infección.....	30
Reservorios Naturales y Vías de Transmisión de STEC	31
Tratamiento para la infección por STEC.....	34
Situación de Uruguay y la región	36
Detección de STEC.....	38
Hipótesis	44
Objetivos generales	45
Objetivos específicos	45
CAPÍTULO 1	47
CAPÍTULO 1. Caracterización bioquímica, confirmación del serotipo/serogrupo y caracterización genómica (PGFE y MLST) de las cepas en estudio	48
Metodología.....	49
Cepas.....	49
Aislamientos.....	49
Extracción de ADN	50
Caracterización Bioquímica.....	50
Detección del serogrupo/serotipo.....	50

Electroforesis en Gel de Campo Pulsado	51
MLST.....	51
Resultados y Discusión.....	53
Caracterización Bioquímica, serogrupos/serotipos	53
Electroforesis en Gel de Campo Pulsado	57
MLST.....	62
CAPÍTULO 2	64
CAPÍTULO 2. Estudio de los genes <i>stx</i> , <i>eae</i> , sus variantes, otros genes de virulencia, sitios de inserción de LEE y clados de virulencia de las cepas en examen	65
Metodología.....	66
Detección de <i>stx1</i> y <i>stx2</i> y sus variantes por PCR	66
Detección del gen <i>eae</i> y sus variantes	66
Detección de genes asociados con la virulencia	67
PCR para <i>katP</i>	67
PCR para <i>espP</i>	67
PCR para <i>espJ</i>	67
PCR para <i>tccP</i>	67
PCR para el gen de <i>lpf</i>	67
PCR para el gen de <i>hcpA</i>	67
PCR para el gen de F9 FIMBRIAE.....	67
PCR para el gen <i>iha</i>	68
Clados de virulencia	68
Sitios de inserción de la isla de patogenicidad LEE.....	70
Resultados y Discusión.....	71
Detección de los genes <i>stx1</i> , <i>stx2</i> y sus variantes por PCR.....	71
Detección del gen <i>eae</i> y sus variantes	77
Detección de genes asociados con la virulencia	80
Clados de virulencia	85
Sitios de inserción de la isla de patogenicidad LEE.....	87
CAPÍTULO 3	91
CAPÍTULO 3. Estudios de susceptibilidad/resistencia a antimicrobianos.....	92
Metodología.....	93
Perfiles de sensibilidad/resistencia.....	93
Búsqueda de genes relacionados a resistencia antimicrobiana	94

Resultados y Discusión.....	95
Perfiles de sensibilidad/resistencia.....	95
Búsqueda de genes relacionados a resistencia antimicrobiana	98
CAPÍTULO 4	102
CAPÍTULO 4. Estudio bioinformático de STEC para buscar genes relacionados a patogenicidad, marcadores moleculares para diagnóstico, y validación de los mismos	103
Metodología.....	103
Identificación de genes candidatos como posibles marcadores moleculares asociados a STEC ...	103
Construcción de una base local e identificación de genes <i>stx</i> y <i>eae</i> para clasificar los genomas ..	105
Búsqueda de genes candidatos	108
Estudio de los genes candidatos: identificación funcional en base a homología, distribución taxonómica y clasificación de los mismos.....	110
Criterios para clasificar los genes candidatos como posibles marcadores moleculares	110
Genes no considerados como marcadores.....	110
Genes considerados como marcadores (que requieren diseño de primers específicos para la especie)	110
Genes considerados como marcadores (que no requieren diseño de primers específicos para la especie)	111
Validación de genes candidatos.....	112
Resultados y Discusión.....	113
Identificación de genes candidatos a ser utilizados como marcadores moleculares asociados a STEC.....	113
Construcción de una base local y <i>blast</i> con genes <i>stx</i> y <i>eae</i> para clasificar los genomas	113
Genes candidatos.....	116
Validación de genes candidatos.....	117
Marcadores Moleculares para diagnóstico	126
CAPÍTULO 5	129
CAPÍTULO 5. Secuenciación genómica completa de 10 cepas locales, búsqueda de genes candidatos a marcadores moleculares y genes de resistencia a antibióticos.....	130
Metodología.....	130
Secuenciación genómica completa de un conjunto seleccionado de cepas	130
ADN para secuenciación	130
Secuenciación genómica	131
Análisis de calidad de las secuencias y mejoramiento de las mismas	131
Ensamblado de genomas	132

Búsqueda de genes candidatos en aislamientos locales	132
Resultados y Discusión.....	133
Estadísticos del ensamblaje	133
Búsqueda de genes candidatos en aislamientos locales	134
CONCLUSIONES.....	136
Conclusiones	137
Perspectivas	143
Referencias.....	145
ANEXO I. Cebadores y condiciones de ciclado de las diferentes PCRs realizadas	168
ANEXO II. Resultados obtenidos en las cepas de referencia/colección.....	171
Detección de <i>stx1</i> y <i>stx2</i> y sus variantes por PCR	171
Distribución de los genes de virulencia <i>stx1</i> , <i>stx2</i> en las cepas de referencia analizadas y sus variantes. (nd: no determinado).....	171
Detección del gen <i>eae</i> y sus variantes	171
Distribución en las cepas de referencia del gen de virulencia <i>eae</i> y sus variantes asociadas al serotipo O157 y no-O157. Se informan los porcentajes correspondientes en relación al total de aislamientos por grupo.	171
Detección de genes asociados con la virulencia.....	172
Sitios de inserción de la isla de patogenicidad LEE.....	172
Estudios de susceptibilidad/resistencia a antimicrobianos.....	172
Anexo III. Diámetros de referencia para los antibióticos ensayados.....	173
Anexo IV. Genes candidatos a estar relacionados con las cepas STEC, función potencial y evaluación como marcador molecular.....	174
ANEXO V. Valores de identidad en los que aparecen los genes candidatos	179
ANEXO VI. Genes de Resistencia adquirida (datos obtenidos en ResFinder).....	182
ANEXO VII. Genes que podrían conferir resistencia en los 10 genomas secuenciados (datos obtenidos de CARD)	186
ANEXO VIII. ANALISIS ESTADISTICO	198
ANEXO IX. RESULTADOS DEL ANALISIS BURST.....	201
Grado de cumplimiento de las diferentes etapas.....	204

Tribunal

Dra. Lorena Pardo, Profesor Adjunto del Departamento de Bacteriología y Virología, Instituto de Higiene, Facultad de Medicina (grado 3).

Dr. Hector Musto, Profesor Titular del Laboratorio de Genómica Evolutiva de la Facultad de Ciencias (grado 5).

Dr. Felipe Scheloto, Ex Profesor Departamento de Bacteriología y Virología de la Facultad de Medicina (grado 5).

Dedicatoria

A todas las personas de luz que la vida puso en mi camino y me ayudaron para poder realizar esta tesis donde crecí como investigador y como persona.

Me llevo muchas enseñanzas y muchos amigos...

Y quiero dedicarla a mis hijos porque al final siempre es por ellos... todo es por ellos ...

Agradecimientos

Quiero agradecer de forma especial a mis tres tutores:

A Gustavo por su apoyo desde el inicio, por confiar en mi y en mi proyecto, por sus continuas enseñanzas, por las alegrías en los logros y por las tantas discusiones que tuvimos en estos cuatro años, pero que al final siempre nos hicieron aprender.

¡Gracias Andres!!! Porque llegue a tu laboratorio con una idea y con poco conocimiento del como, y me guiaste y formaste en un área totalmente nueva para mi, gracias por tu paciencia y tu buena disposición siempre.

¡Gracias Walter, por siempre enseñarme y prenderte en cada uno de mis proyectos, has formado parte de mi formación en estadística desde mi tesis de maestría, con la alegría y humildad que caracteriza a un grande, mil gracias!!!

Gracias a los miembros del tribunal por haber aceptado formar parte de el y haberme acompañado ya en varias instancias desde la presentación del proyecto y el informe de avances, donde sus preguntas y correcciones siempre aportaron a que mi proyecto fuera cada vez mejor, así como a mi formación.

Gracias a Pablo Zunino y Laura Bentancour que formaron parte de este proyecto y me acompañaron en gran parte de mi formación.!!!!

Gracias a mis compañeros del Departamento de Bacteriología, a quienes me enseñaron, Vale, Ines gracias por lo que me formaron en PFGE, a las que me sacaban las PCR para poder llegar al colegio a buscar a Emi, en especial Gladis y Tamara, gracias Anita por ayudarme en los antibiogramas, por tu apoyo continuo en las preparaciones de medios, por presionarme para que termine, gracias Lore a quien consulte en varias oportunidades, a Pau que me enseñó desde donde estaba el agua hasta a utilizar el nanodrop, gracias a todos lo que de una forma u otra me ayudaron o apoyaron. ¡Gracias a Nico del 38 que me ayudó cuando en un enero me dejaron de andar las PFGE!!!

Gracias a mis compañeros del Laboratorio de Bioinformática, que me enseñaron con mucha paciencia y total respeto por mis limitaciones en esa área, en especial a Javier y Germán, que sin dudarlos me ayudaban, aunque sea domingo, que era cuando yo a veces me podía sentar a escribir o analizar datos.

Gracias a la Agencia Nacional de Investigación e Innovación, por haber elegido mi proyecto y haberme otorgado 3 años de beca lo cual me permitió poder realizar este post grado.

Gracias a mi ex jefe Gustavo Lancibidad quien me impulsó a hacer este postgrado, y siempre confió en mi.

Gracias a Marisol Villar, gerenta de la empresa Biko S.A., para quien trabaje al inicio de esta tesis y quien sin dudarlos apoyó mi idea desde un comienzo.

Gracias a mis compañeras de Bromatología en especial Mailen y Viviana, a quienes consulte en varios temas a lo largo de esta tesis.

¡Gracias a Stephano Morabito (jefe del Laboratorio de referencia de STEC en Comunidad Europea) y su equipo en especial a Valeria por haber secuenciado mis cepas!!!

¡Gracias a Gerardo Leotta de Argentina, quien me ha ayudado en varios aspectos de mi tesis, desde pasarme contactos, hasta condiciones de PCRs, muchas gracias!!

¡Gracias a la gente del Latu, a Paula, Inés y Ana por haber sido un lugar de consulta en varias ocasiones, gracias por la disposición y ayuda cada vez que las necesite!!!

¡Gracias a vos Rob, porque fuiste mi motor cuando a veces sentí que no podía mas!!, por las tardes que estuviste a mi lado atendiéndome para que me sienta a escribir, o las que cuidaste a Emi para que me pueda concentrar!

Gracias a la vida por haberme permitido hacer este Doctorado, siempre le digo a mis hijos y a mis alumnos “síntanse privilegiados por poder estudiar”, así me siento yo, afortunada y feliz. Mis gracias son infinitas...

Resumen

Las cepas de *Escherichia coli* productoras de toxina Shiga (STEC) pueden causar en niños menores de cinco años infecciones leves, asintomáticas, diarrea acuosa y diarrea con sangre o procesos más severos como colitis hemorrágica o síndrome urémico hemolítico (SUH). El SUH puede ser mortal en la etapa aguda o dejar secuelas a largo plazo que requieren diálisis crónica o trasplante renal, siendo la primera causa de insuficiencia renal aguda en niños pequeños. En adultos, la complicación se presenta habitualmente en forma de púrpura trombótico trombocitopénico. Las cepas STEC pueden ser responsables de infecciones del tracto urinario con desarrollo posterior o no de casos de SUH.

El ganado bovino constituye el principal reservorio de STEC y es un eslabón importante en el control de la diseminación de estos agentes. La transmisión de este agente se puede dar por contacto con animales, por contacto directo entre personas o por la ingesta de alimentos contaminados con heces de estos animales.

El diagnóstico y evaluación de la capacidad patogénica de STEC, basado en la detección de los genes *stx* y *eae* (entre otros), tiene limitaciones. A nivel mundial aparecieron cepas *stx* positivas y *eae* negativas con capacidad patogénica definida, por lo cual pensar solo en estos dos genes a la hora de realizar un tamizaje no sería adecuado o completo. Es necesario ampliar las secuencias blanco a estudiar para realizar un diagnóstico completo de la presencia de STEC con mayor capacidad para producir daño en seres humanos. Los estudios locales existentes sobre la distribución y características de los atributos de virulencia típicos (*stx* y *eae*) y de atributos de virulencia adicionales en cepas de STEC O157:H7 y no-O157 no permiten aportar datos para el diseño de nuevas secuencias blanco a ser utilizadas en el diagnóstico o para valorar la capacidad patogénica de las cepas STEC circulantes.

El objetivo del presente trabajo fue realizar la caracterización de un conjunto de cepas locales de *Escherichia coli* productoras de toxina Shiga aisladas entre 2005 y 2017, a partir de alimentos, bovinos y casos clínicos, e identificar nuevas secuencias blanco que ayuden a su detección y control.

Los aislamientos y la caracterización bioquímica se realizaron por técnicas clásicas, se confirmó el serogrupo/serotipo por PCR. Las cepas fueron genotipificadas por Electroforesis de Campo Pulsado (PFGE). También se realizó MLST a un conjunto seleccionado de cepas. Se estudiaron las variantes de los genes *stx* y de los genes *eae*, así como la presencia de otros genes implicados en la virulencia por PCR. Esto permite conocer la

distribución de los diferentes atributos de virulencia y sus variantes. También se analizaron los sitios de inserción de la isla de patogenicidad LEE, así como los clados a los que pertenecen las cepas O157.

Se estudió la distribución de los perfiles de sensibilidad/resistencia frente a diferentes antibióticos de uso común en la clínica humana y veterinaria, a los efectos de conocer la contribución relativa de estos agentes zoonóticos a la carga local de resistencia antimicrobiana.

Asimismo, se realizó un estudio bioinformático de decenas de miles de genomas completos de *E. coli* con el objetivo de identificar genes relacionados a la patogenicidad y secuencias blanco (genes) que puedan ser usados como marcadores moleculares asociados a STEC y/o a los diferentes serotipos de STEC, y obtener secuencias blanco candidatas a ser utilizadas a futuro para su diagnóstico y/o evaluación de su potencial patogénico. Se realizó la secuenciación completa de 10 genomas, 3 pertenecientes al clado 8 y 7 provenientes de aislamientos clínicos con el objetivo de realizar MLST, buscar la presencia de los genes candidatos a los efectos de evaluar su presencia en cepas locales y detectar la presencia de genes de resistencia a antibióticos.

Según los resultados obtenidos, en el conjunto de cepas analizadas, el serotipo más frecuente en alimentos correspondió a O157:H7, seguido por el serotipo O26. Con respecto a los serogrupos/serotipos presentes en los casos clínicos estudiados en esta tesis correspondieron a: O157:H7 (uno de un caso de ITU), O145 (dos de dos casos de SUH), O26 (uno de un caso de SUH), O26:H11 (uno de un niño con diarrea sangrinolienta), O153:HNT (uno de un niño con diarrea) y O111 (uno de un niño con SUH). Los cuatro aislamientos obtenidos de ganado, dos correspondieron a O157 y dos a O26.

Los resultados del MLST y de la PFGE son concordantes y apoyan la idea de clonas circulantes que aparecen tanto en ganado, como en los alimentos y en los casos clínicos y persisten a lo largo de los años.

Se han podido conocer las distribuciones de los genes *stx* y sus variantes, siendo *stx2* la de mayor prevalencia en el total de aislamientos estudiados. Con respecto a las variantes, *stx1a* es la más frecuente en el total de aislamientos, mientras que si el análisis lo realizamos solo en los aislamientos humanos las variantes a y c presentaron la misma frecuencia. Con respecto al gen *stx2*, *stx2c* es la variante con mayor prevalencia si el análisis se realiza con respecto a los aislamientos O157 y a los totales, en cambio si se analizan las cepas no-O157, así como los aislamientos de origen humano, la variante 2a es la que presenta mayor prevalencia. La combinación de las variantes 2a, c y d (la variante d debería ser confirmada por WGS (secuenciación genómica))

resultó ser la más frecuente tanto en los aislamientos O157 como en el total, mientras que la combinación 2 a y 2 c fue la más frecuente en las cepas no-O157 y en las humanas.

Se determinó la distribución del gen *eae* que codifica para la proteína de membrana externa intimina, responsable de la adherencia estrecha de STEC con los enterocitos, y sus variantes $\gamma 1$ y $\beta 1$. La variante $\gamma 1$ se presenta con alta frecuencia, resultó ser la única identificada en las cepas O157, mientras que la variante $\beta 1$ fue determinada en un 12% de las cepas estudiadas. En las cepas no-O157 solo se identificó esta última. En los aislamientos de origen humano se encontraron ambas variantes, siendo la $\beta 1$ la más frecuente. Este hecho está relacionado a los serotipos correspondientes a las cepas de este grupo.

Se evidenció una rica distribución de los factores de virulencia adicionales. En todos los casos se presentaron con una mayor frecuencia en las cepas O157 que en las no-O157. Esto puede deberse en parte a los cebadores utilizados, ya que muchos de ellos fueron desarrollados para O157.

Solo tres cepas se identificaron como pertenecientes al clado 8. Cabe destacar que dos de las cepas que correspondieron a este clado se asociaron en el mismo pulsotipo en la PFGE, por lo cual presentarían perfiles genéticos similares (97% de identidad). La baja incidencia de estos clados hipervirulentos en nuestro país podría entonces ser uno de los factores que explicaría las diferencias en lo que respecta a la distribución de los distintos serotipos STEC asociados a casos de SUH entre Uruguay y Argentina.

En lo que respecta a los sitios de inserción de la Isla de Patogenicidad LEE (*pheU*, *selC* y *pheV*), muchos de los aislamientos presentaron más de un sitio ocupado; en estos casos se podría saber cuáles son los sitios ocupados, pero no se podría afirmar en cuál de estos sitios se encuentra la isla que codifica para *eae*.

La tasa de resistencia encontrada en este conjunto de STEC (10%) sugiere que su contribución local a la carga de resistencia a los antimicrobianos es similar a la observada en Argentina y menor que la reportada en Brasil. Sin embargo, los genes responsables, probablemente se encuentren ubicados en integrones de clase 1, pudiendo ser fácilmente transferibles a otras bacterias Gram-negativas intestinales. La alta carga de genes de resistencia encontrados, incluso en aislamientos susceptibles, sugiere que estos patógenos podrían contribuir al problema de la resistencia a los antimicrobianos, destacando el papel local de STEC como reservorio de genes de resistencia transferibles, aunque es de destacar que no todos los genes encontrados son transferibles.

Se han podido identificar 40 secuencias relacionadas a STEC que podrían servir para comprender aspectos de la biología de STEC y evaluación de la capacidad virulenta. Dentro de ellas se determinaron doce secuencias blanco que podrían ser utilizadas como marcadores moleculares para apoyar el diagnóstico de este patógeno. También se identificaron 3 secuencias que parecerían tener interés biológico, y ser candidatas a blancos para drogas que bloqueen la expresión de STX.

Se han secuenciado y ensamblado de novo 10 genomas de cepas locales, con buena calidad de ensamblado, en los cuales se ha podido realizar el MLST, búsqueda de genes de resistencia a antibióticos y donde se encontraron las 40 secuencias relacionadas a STEC determinadas previamente, y en los mismos rangos de identidad en que fueron validadas. Dentro de los 37 genes se encuentran los zzzz.12163 (codifica para una proteína inhibidora de la exonucleasa bacteriana), zzzz.3399 y zzzz.3404 (estos últimos codifican para un efector del sistema de secreción de tipo III), que al parecer presenta un enorme interés biológico porque podrían servir como blanco para drogas. Los resultados obtenidos en relación a la presencia de los genes candidatos a marcadores moleculares tanto para comprender la biología de STEC, como los que fueron propuestos para el diagnóstico, o posibles blancos para drogas, son alentadores a su uso.

Palabras clave: *E. coli* enterohemorrágica, STEC, serotipos, PFGE, MLST, genes de virulencia, clados, genes de resistencia, marcadores moleculares, secuenciación genómica, genómica comparativa.

Introducción

Generalidades de *Escherichia coli*

Dentro del conjunto de bacterias asociadas a diarrea en seres humanos se destaca el patógeno entérico *Escherichia coli*. *E. coli* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, integrada por bacilos Gram negativos no esporulados, móviles con flagelos peritricos o inmóviles, aerobios-anaerobios facultativos, capaces de crecer en agar MacConkey, catalasa positivos y oxidasa negativos. Se trata de bacterias de crecimiento rápido y de amplia distribución en el ambiente; forman parte de la microbiota de diferentes seres vivos. *E. coli* es la bacteria anaerobia facultativa predominante de la microbiota colónica del ser humano; coloniza el tracto gastrointestinal del niño a las pocas horas de nacido y establece una relación con el hospedero de "mutuo beneficio". La mayoría de las cepas de *E. coli* son comensales, pero algunas de ellas pueden causar enfermedad tanto en el hombre como en los animales. Las cepas patogénicas de *E. coli* son muy diversas; ciertos **patotipos** o **virotipos** causan enfermedad entérica y son conocidos como *E. coli* diarreogénicos (ECD), otros son responsables de procesos patológicos extraintestinales (ExPEC) como infecciones del tracto urinario, meningitis y sepsis (Kaper *et al.*, 2004).

El concepto de **patotipo/virotipo** se utiliza para definir un conjunto de cepas de *E. coli* que presentan mecanismos patogénicos similares, causan enfermedades parecidas y muestran una epidemiología característica.

***Escherichia coli* productor de toxina Shiga (STEC)**

Las cepas de *E. coli* **diarreogénicas** (ECD) comprometen fundamentalmente el tracto gastrointestinal de los seres humanos y en algunos casos de animales, incluidos aquellos destinados al abasto. Estas cepas no habitan normalmente en el tubo digestivo de los seres humanos, son de origen exógeno y se transmiten directamente de persona a persona, de animal a persona, o indirectamente a través de agua y/o alimentos contaminados. De acuerdo a sus mecanismos patogénicos principales este conjunto de cepas se divide actualmente y de forma esquemática en 6 virotipos o patotipos: *E. coli* enterotoxigénico (ETEC) productor de enterotoxinas termolábiles o termoestables (LT y ST, respectivamente), *E. coli* productor de toxinas tipo Shiga (STEC), *E. coli* enteroinvasor (EIEC), *E. coli* enteroagregativo (EAEC), *E. coli* enteropatógeno clásico (EPEC) y *E. coli* con adherencia difusa (DAEC) (Nataro *et al.*, 1998). Últimamente se ha propuesto un nuevo patotipo denominado AIEC (*E. coli* adherente e invasor), vinculado con la enfermedad de Crohn. Sin embargo, debemos tener en cuenta que existen aislamientos que cumplen con la definición de 2 patotipos o incluso de *E. coli* diarreogénicas (ECD) y *E. coli* patógenas extraintestinales (ExPEC), lo cual quedó claramente manifestado luego del brote de 2011 en Alemania con una cepa híbrida (O104:H4) que portaba factores de virulencia de dos patotipos de ECD diferentes (*E. coli* enteroagregativa y *E. coli* productora de toxina Shiga) (Bielaszewska *et al.*, 2011). Es por este motivo, que esta clasificación presenta sus limitaciones, y dada la plasticidad del genoma de *E. coli* surge la duda de si es válida la clasificación en patotipos en la era de la secuenciación del genoma completo o WGS (del inglés *Whole Genome Sequencing*) (Robins *et al.*, 2016; Santos *et al.*, 2020).

Los aislamientos de *E. coli* se diferencian serológicamente por los antígenos somáticos (O), flagelar (H) y capsular (K). Hasta el presente se han identificado más de 181 antígenos O y 53 antígenos H. En cada aislamiento se puede definir el serogrupo por el antígeno O, mientras que los serotipos vienen dados por combinaciones de antígenos O y H. Es de destacar que las cepas patógenas de *E. coli* poseen diferentes tipos de factores de virulencia que contribuyen conjuntamente a potenciar su patogenicidad; esto motiva que la virulencia de *E. coli* sea considerada como un fenómeno multifactorial (Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición AESAN, 2012).

Las cepas STEC son aquellas que producen al menos un tipo de citotoxinas llamadas toxinas Shiga (Stx), denominadas así por su similitud estructural y funcional con las citotoxinas producidas por cepas de *Shigella dysenteriae* serotipo 1. En un primer momento se las denominó Verotoxinas por su capacidad de producir un efecto citotóxico sobre células Vero (Knowalchuk *et al.*, 1977), por lo cual las terminologías STEC y VTEC tienen el mismo significado. Las toxinas Shiga son un tipo de toxina AB₅ que consiste en una subunidad A monomérica, enzimáticamente activa, unida no covalentemente a una subunidad B pentamérica, responsable de unirse al glucoesfingolípido globotriaosilceramida (Gb₃, también conocido como antígeno del grupo sanguíneo CD77 o Pk), un receptor específico en la superficie celular (Johannes *et al.*, 2010; Joseph *et al.*, 2020). Se dividen en 2 categorías Stx1 y Stx2, inmunológicamente distintas, las cuales comparten la misma estructura y función, pero solo presentan un 50% de homología. Dentro de cada una existen subtipos o variantes (Joseph *et al.*, 2020). La producción de estas toxinas representa el principal factor de virulencia de las cepas STEC y define el patotipo. En general las cepas productoras de Stx2 producen enfermedades más severas (Varela *et al.*, 2008; Byrne *et al.*, 2014; Matussek *et al.*, 2016).

Estas toxinas son muy potentes ya que presentan la habilidad de inhibir la síntesis proteica en las células eucariotas. Pertenecen a la familia de proteínas inactivadoras de ribosomas (Walsh *et al.*, 2013).

Mecanismo de acción de la toxina Shiga

La base patogénica del SHU está determinada por el daño de las células endoteliales de los pequeños vasos del colon, riñón y sistema nervioso central. Los mecanismos que gobiernan la circulación de la toxina Shiga desde el intestino a los órganos diana aún no se conocen completamente, pero se sabe que la misma difunde muy rápidamente a los tejidos afectados, ya que presenta un tiempo de vida media en suero de 5 minutos. Como se mencionó anteriormente su receptor en humanos es el Gb3 que se expresa en podocitos, células endoteliales microvasculares, plaquetas, linfocitos B del centro germinal, eritrocitos y neuronas (Joseph *et al.*, 2020).

Después de la lisis bacteriana, las toxinas Shiga liberadas por las bacterias atraviesan la barrera intestinal. Los enterocitos normales no expresan Gb3. Por tanto, se cree que Stx se transloca a través de la unión estrecha del epitelio intestinal al unirse a Gb3 expresado en las células de Paneth, que están asentadas en las criptas profundas del intestino delgado. De esta forma ganan acceso a la circulación sanguínea donde tienen acceso a sus tejidos diana (Joseph *et al.*, 2020).

Una vez allí, su subunidad B se une a su receptor Gb3. Posteriormente el complejo toxina - receptor se internaliza por endocitosis. La subunidad A tiene 2 fragmentos (A1 y A2), que a nivel del endosoma se mantienen unidos por enlaces disulfuro. La toxina evita la degradación lisosomal y se dirige hacia el retículo endoplásmico, donde se reduce la unión disulfuro y se produce la activación de la misma por escisión en sus dos fragmentos. Esto posibilita que A1

se transloque al citoplasma donde puede ejercer sus efectos citotóxicos que consisten en escindir un residuo de adenina del ARN 28S, de la subunidad ribosómica 60S, inhibiendo así la síntesis de proteínas y desencadenando las respuestas de estrés ribotóxico del retículo endoplásmico. Además, se activan múltiples vías de señalización de estrés y apoptóticas, y estimula la producción de citocinas inflamatorias por las células diana (Kavaliauskiene *et al.*, 2017; Joseph *et al.*, 2020) (ver imagen 1).

Existen otros dos mecanismos para el ingreso a la célula y la distribución de la toxina hacia diferentes órganos además de la endocitosis recién descrita, ellos son a) Macropinocitosis (MPC): permite la entrada de Stx cuando el receptor Gb3 no es expresado por la célula, como en el caso de los enterocitos. La MPC ocurre independientemente de T3SS y de la intimina, es decir, es estimulada por la reorganización de la actina mediante la proteína P secretada por *E. coli* (EspP: *E. coli* secreted protein P) y b) Transcitosis: mediante vesículas bacterianas la toxina pasa de un espacio extracelular a otro. Este mecanismo aún está en estudio (Farfán *et al.*, 2016).

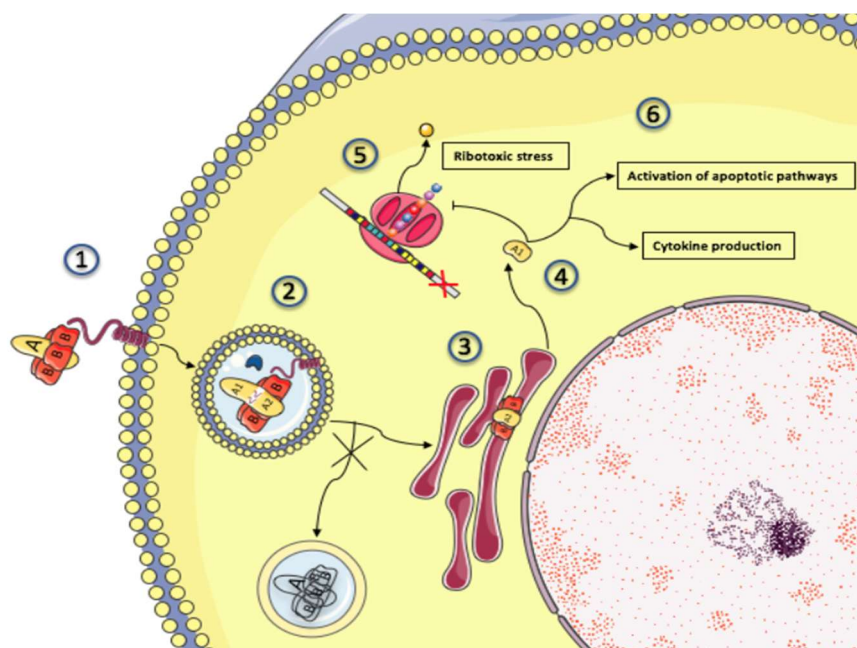


Imagen 1. Tráfico intracelular y citotoxicidad de la toxina Shiga (tomado de Joseph *et al.*, 2020).

Variantes de toxina Shiga

Los dos tipos de toxina Shiga Stx1 y Stx2, como se mencionó anteriormente se subdividen en subtipos. En el caso de Stx1 se han descrito los subtipos Stx1a, Stx1c, Stx1d, y recientemente Stx1e, el cual fue reportado en *Enterobacter cloacae*, siendo este un subtipo novedoso, ya que presenta reactividad limitada con anticuerpos anti-Stx1. Para Stx2 los subtipos determinados hasta el momento según el último informe de la Autoridad de Seguridad Alimentaria Europea (EFSA) son 12, siete bien caracterizados (Stx2a, Stx2b, Stx2c, Stx2d, Stx2f y Stx2g), cada uno de los cuales se divide en variantes que se diferencian en uno o dos aminoácidos (Scheutz *et al.*, 2012; FAO, 2018). Recientemente se han reportado cinco nuevas variantes para stx2 (stx2h, stx2i, stx2j, stx2k y stx2l). En la actualidad, no existe un protocolo validado para la detección y subtipificación de estos nuevos subtipos stx1e y stx2h-stx2l (EFSA, 2020).

Dentro del tipo Stx2, los subtipos Stx2a, Stx2c y Stx2d activable, están asociados con un riesgo mayor de enfermedad humana (Bielaszewska, *et al.*, 2006a; Scheutz *et al.*, 2012; Fierz *et al.*, 2017). Por el contrario, Stx2e se asocia principalmente con la enfermedad edematosa porcina y Stx2f se aisló por primera vez de las heces de palomas salvajes (Schmidt *et al.*, 2000; Scheutz *et al.*, 2012). Estos subtipos en pocas ocasiones se han reportado asociados a casos de enfermedad en humanos (Friedrich *et al.*, 2002; Prager *et al.*, 2009; Fuller *et al.*, 2011; Fiesema *et al.*, 2014; DeRauw *et al.*, 2018; Joseph *et al.*, 2020).

Los genes que codifican estas toxinas se encuentran en fagos temperados integrados en diferentes sectores del genoma bacteriano. Hasta el momento se han descrito nueve sitios de inserción *wrbA*, *yehV*, *yecE*, *sbcB*, *Z2577*, *ssrA*, *prfC*, *argW*, *torS-torT* (Schmidt, 2001; Serra *et al.*, 2007).

Factores de virulencia adicionales de STEC

Una reciente revisión de la Autoridad de Seguridad Alimentaria Europea (EFSA), que utilizó trabajos y reportes publicados entre 2012 y 2019, estableció que, desde el enfoque molecular, todas las cepas STEC pueden considerarse patógenas y capaces de causar enfermedad. Asimismo, expresó que futuros estudios que utilicen herramientas como la secuenciación del genoma completo (WGS), buscarán genes de virulencia adicionales, o combinaciones de estos que estén más asociados a enfermedad grave en seres humanos. Señaló que cualquier predicción con respecto a la severidad del caso clínico siempre será incierta ya que la sola presencia de el o los genes de virulencia no establece una respuesta lineal, porque el tipo de respuesta de un organismo es un suceso multifactorial, que entre otros depende de la expresión de estos genes en las diferentes cepas bacterianas y del estado inmunológico del huésped (EFSA, 2020).

Gen *eae* codificador de intimina y factores de virulencia adicionales

Si bien la producción de toxinas Shiga es el atributo de virulencia que define este patotipo, las cepas STEC producen otra cantidad de factores que participan en la patogenia (Karmali, 2004; FAO, 2018; EFSA, 2020). Uno de los factores principales de virulencia reportados para las cepas STEC es producido por el gen *eae*. La presencia o ausencia de este gen nos permite hablar de STEC *eae+* y STEC *eae-*. *E. coli* enterohemorrágico (un subgrupo dentro del conjunto de STEC definido en función de su potencial patogénico y capacidad de producir brotes de enfermedad severa), es responsable de los procesos más severos en el hombre como se presentará más adelante (Joseph *et al.*, 2020). El gen *eae* codifica para la proteína de membrana externa intimina, responsable de la adherencia estrecha de STEC y EPEC con los enterocitos. Este gen se encuentra en la isla de patogenicidad denominada LEE (del inglés

locus of enterocyte effacement) (ver imagen 2). Esta isla que posee 41 genes y está organizada en 7 operones (LEE de 1 a 7), y cuenta además con unidades de transcripción individuales (*etgA*, *cesF*, *map* y *EscD*). Posee así todos los genes para producir un tipo de lesión A/E (por los términos en inglés *Attaching and Effacing*), explicada más adelante en esta tesis. Cabe señalar que LEE presenta los mismos genes en EHEC y en EPEC y en el mismo orden (Kaper *et al.*, 2004; Gaytán *et al.*, 2016; Joseph *et al.*, 2020).

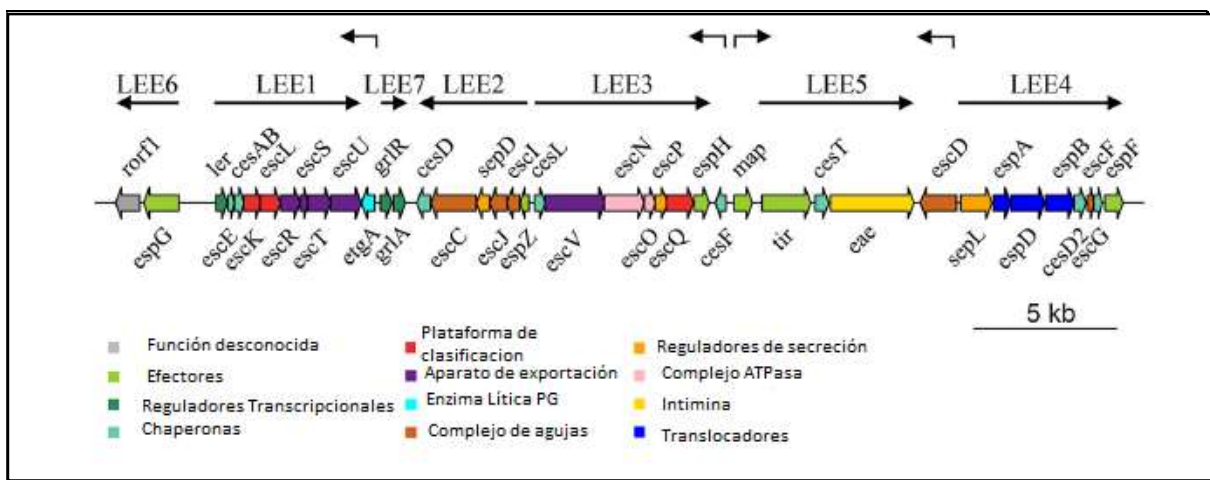


Imagen 2. Estructura de la isla de patogenicidad LEE de la cepa de *E. coli* E2348/69 (EPEC, O127:H6). Los genes se colorearon de acuerdo a su categoría funcional. La organización en operones de la isla (de LEE 1 a LEE 7 se indica con flechas sobre los genes mientras que las unidades de transcripción individuales aparecen sin flecha (*etgA*, *cesF*, *map* y *EscD*) (tomado de Gaytán *et al.*, 2016).

Dentro de esta isla también se encuentran otros genes involucrados en la patogenicidad de STEC, los que codifican para los distintos componentes del sistema de secreción tipo III (T3SS), que forman el complejo de aguja y se encuentran ubicados en LEE1, LEE2 y LEE3; para diferentes proteínas efectoras *esp* (del inglés *E. coli secreted proteins*), genes ubicados en LEE2, LEE3, LEE4 y LEE6; y para el receptor traslocado de intimina (Tir) (en LEE5), entre otros (Kaper *et al.*, 2004; Gaytán *et al.*, 2016).

Se han descrito 3 sitios cromosómicos en los cuales se puede insertar LEE y corresponden a genes que codifican ARNs de transferencia (*selC*, *pheU*, y *pheV*). *pheV* y *pheU* son genes que

codifican para ARNt de fenilalanina, mientras que en *sefC* se encuentra el gen para el ARNt de selenocisteína. El estudio de los mecanismos de origen de LEE y la diseminación entre cepas de *E. coli* es importante para comprender los procesos de evolución y la aparición de estas bacterias patógenas (Jerse *et al.*, 1990; McDaniel *et al.*, 1995).

Como se mencionó más arriba, las cepas STEC *eae* + forman parte de un grupo de patógenos que presentan un mecanismo de patogenicidad similar, el cual se caracteriza por producir un daño histológico muy particular en las células del intestino del hospedero, denominado lesión A/E (ver imagen 3).

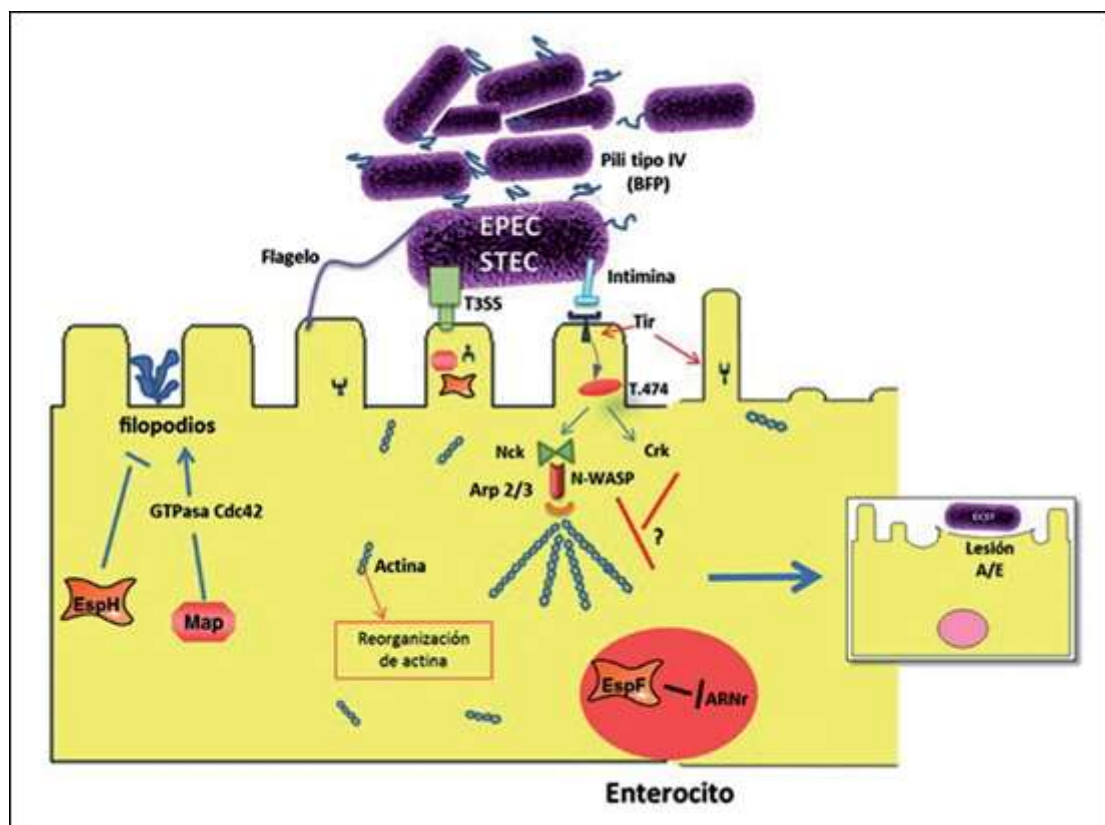


Imagen 3. Esquema de adherencia de EPEC típica y STEC. Lesión A/E (Tomado de Farfán *et al.*, 2016).

Caracteriza este tipo de lesiones el borramiento de las microvellosidades epiteliales y la posterior formación del pedestal (estructuras que sobresalen y son ricas en actina), que permite una interacción íntima entre la bacteria y la célula intestinal (Nataro *et al.*, 1998; Farfán *et al.*, 2016). Este mecanismo se inicia con la adhesión a células epiteliales intestinales por medio de la fimbria larga polar *lpf* (del inglés *long polar fimbriae*). El T3SS (ver imagen 4) permite el ingreso a las células del huésped de proteínas bacterianas efectoras gracias a una compleja estructura filamentosa que posibilita que estos patógenos ensamblen en la membrana citoplasmática de las células eucariotas un poro de translocación a través del cual inyectan las proteínas efectoras directamente en el citoplasma. El montaje de este complejo sistema se encuentra estrictamente regulado por chaperonas que trabajan en coordinación con dos interruptores moleculares y la llamada plataforma de clasificación (Gaytán *et al.*, 2016). Una de las proteínas traslocadas es Tir, la cual una vez que se encuentra en la célula del huésped se inserta en su membrana citoplasmática exponiendo su región extracelular que funciona como receptor de la intimina permitiendo así la unión estrecha de STEC (Kaper *et al.*, 2004).

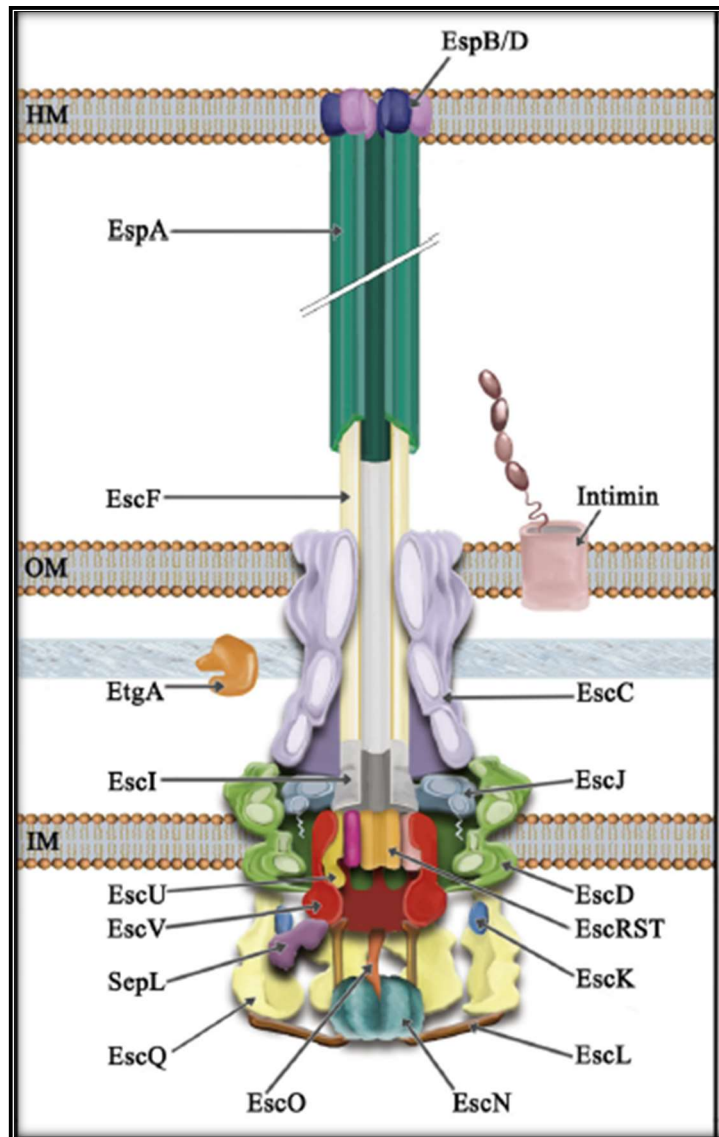


Imagen 4. Esquema de la estructura del T3SS. Como puede observarse presenta un core central con múltiples anillos incrustados en la membrana bacteriana, una varilla interna periplásmica, un aparato de exportación transmembrana en la membrana interna y componentes citosólicos, que incluyen una compleja ATPasa y el anillo en C. Además, se ensamblan dos apéndices huecos distintos en la cara extracelular del cuerpo basal creando un canal para la secreción de proteínas: una aguja de aproximadamente 23 nm y un filamento que se extiende hasta 600 nm (tomado de Gaytán *et al.*, 2016).

La presencia del gen *eae* permite clasificar a las cepas STEC como *eae+* y *eae-*, y valorar su capacidad patogénica. En general, la presencia de *eae* se asocia a cuadros más graves. Sin embargo, cabe destacar que se han reportado cepas STEC *eae-* que también son capaces de producir enfermedad severa en el hombre (como veremos más adelante), las cuales utilizan otros mecanismos de adherencia diferentes a intimina, como la adhesina autoaglutinante STEC (Saa) o el regulador transcripcional AggR, que es característico de *E. coli*

enteroagregativa (EAEC). Un ejemplo lo constituyó la cepa responsable del brote en Alemania en el año 2011, correspondiente al serotipo O104:H4 que causó el mayor brote de Europa. Esta cepa consistía en una *E. coli* enteroagregativa (EAEC), probablemente originaria de África, que adquirió el bacteriófago que codifica Stx2 (cepa híbrida EAEC-STEC). Entre 1992 y 2012, se describieron cuatro cepas híbridas EAEC-STEC de diferentes serotipos que provocaron un pequeño brote y seis casos esporádicos de SUH (Bielaszewska *et al.*, 2011; Beutin *et al.*, 2012; Joseph *et al.*, 2020; EFSA, 2020). Estos son ejemplos de la gran variabilidad y versatilidad genómica asociada a *E. coli* en general y a STEC en particular, lo cual desafía los conceptos de seropatogenicidad de STEC clásicos propuestos por Karmali *et al.*, en 2003, debido a que la complejidad de STEC dificulta la posibilidad de definir si una cepa es o no patógena y a qué virotipo corresponde. La gran plasticidad de su genoma le permite adquirir factores de virulencia de otros organismos, lo que lleva a la aparición de éstas cepas híbridas (definidas como portadoras de genes de virulencia de distintos virotipos diarreogénicos) emergentes de manera impredecible (EFSA, 2020; Santos *et al.*, 2020).

Otros genes de virulencia descritos

Se sabe que otras estructuras de la superficie bacteriana participan de la adherencia de STEC a diferentes células eucariotas. Entre estas se encuentran: long polar fimbriae (Lpf), hemorragic coli pillus (HCPA), *E. coli* common pilus (ECP), F9 fimbriae e IrgA Homologue Adhesin Iha (Mahajan *et al.*, 2009; Kudva *et al.*, 2012; AESAN, 2012).

Por otra parte, el plásmido pO157 de STEC codifica para otros factores de virulencia, aportando genes para catalasa-peroxidasa (KatP), adhesina ToxB57, metaloproteasa dependiente de zinc (StcE) y para la enterohemolisina (Ehx), cuyas funciones están

principalmente enfocadas a mediar la unión a la célula hospedera, degradación de mucinas y glicoproteínas, y regular mecanismos de inflamación y citotoxicidad (Farfán *et al.*, 2016).

También encontramos la proteína EspJ, asociada a un mecanismo para asegurar que las bacterias no sean internalizadas por las células fagocíticas que se reclutan en la luz del intestino como resultado de la inflamación, una vez que se establece la colonización del epitelio, o después de que se haya montado una respuesta inmune adaptativa (Marchés *et al.*, 2008). La misma forma un operón con Tccp (proteína de acoplamiento Tir-citoesqueleto), otra de las proteínas efectoras de STEC, y ambas están codificadas en el profago CP-933U (Garmendia *et al.*, 2005; Matussek *et al.*, 2017). Tccp es una proteína que participa en el ensamblaje de actina en la formación del pedestal, como molécula adaptadora, desencadenando la polimerización de actina localizada junto a EspF. Tccp consta de una región N terminal única de 80 aminoácidos, que está involucrada en la translocación de proteínas y varias repeticiones idénticas de 47 residuos de prolina (Garmendia *et al.*, 2004; Garmendia *et al.*, 2006; Ogura *et al.*, 2007).

STEC O157 vs. no-O157

Actualmente se describen más de 400 serotipos STEC, siendo los más frecuentes e importantes como agentes de enfermedad humana: O157:H7, O157:H- y dentro de los no-O157 para Europa los serogrupos más importantes son O26, O103, O91, O146 y O145 mientras que para Estados Unidos los conocidos *big six* incluyen: O26, O45, O103, O111, O121 y O145. Existe amplia variación geográfica con respecto a la prevalencia de los serotipos STEC: hay países como el nuestro y Brazil en donde predominan los cultivos no-O157; por otra parte, en Argentina predominan los cultivos O157:H7. Es así que una forma útil de clasificación de

las cepas STEC es en O157 y no-O157 (Nataro *et al.*, 1998; AESAN, 2012; EFSA, 2020) (ver imagen 5).

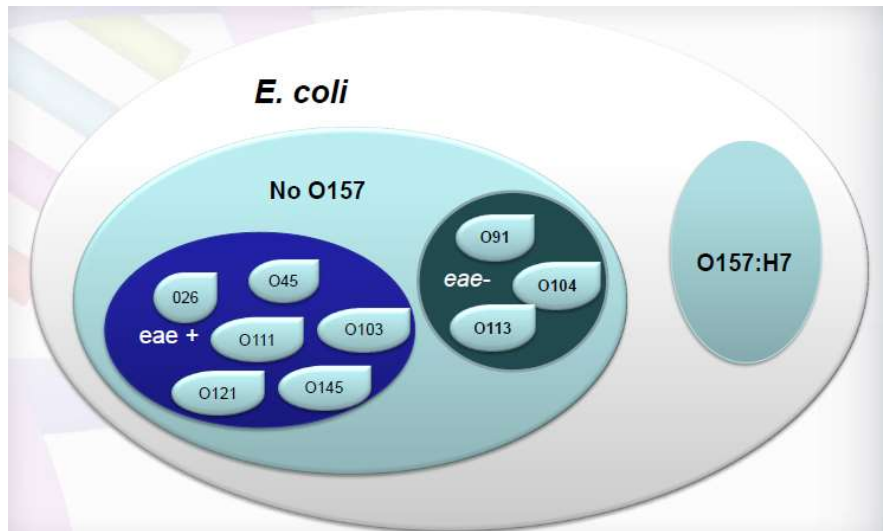


Imagen 5. Clasificación de STEC en O157 y no-O157.

Las cepas STEC se han convertido en un importante patógeno transmitido por alimentos, pero como hemos mencionado hay un subgrupo de ellas que producen cuadros más graves y están más asociados a brotes, denominado EHEC. Algunas de estas cepas STEC no solo producen *stx*, sino que además causan lesiones de tipo A/E, poseen un plásmido de virulencia de 60-Mda, y se denominan EHEC típicas. Dentro de ellas se encuentran cepa de los serotipos O157:H7, O26:H11, O103:H2, O111:H8, O121:H19 y O145:H28. Por otra parte, las cepas STEC asociadas a enfermedad severa en seres humanos que no producen lesión A/E y no poseen el mencionado plásmido, y se asocian con colitis hemorrágica o SUH, se denominan EHEC atípicas. Estas incluyen cepas de los siguientes serotipos O91:H21, O113:H21, O104:H4, O104:H21, O104:H28, O76:H19, O128:H2, O146:H28. Encontramos un grupo más recientemente definido como las EHEC “emergentes” que abarcan los serotipos O5:H, O15:H2, O45:H2, O55:H7, O103:H25/H11, O118:H16, O123:H11, O165:H25, O172:H25,

O177:H, O59:H19, O102:H6, O174:NM y O174:H21, O63 (Gould *et al.*, 2013; EFSA BIOHAZ, 2013; Oderiz *et al.*, 2018; EFSA, 2019). Además, un serogrupo inusual, O80, está surgiendo actualmente en Francia y Europa (Mariani-Kurkdjian *et al.*, 2014; Soysal *et al.*, 2016; Fierz *et al.*, 2017; Wijnsma *et al.*, 2017; Cointe *et al.*, 2018; Nüesch-Inderbinen *et al.*, 2018; Joseph *et al.*, 2020).

STEC y su capacidad de producir enfermedad

Como se mencionó anteriormente, la patogenia de STEC es muy compleja e implica la expresión y/o sobreexpresión de una variedad de genes, incluidos algunos cuyo producto génico no está directamente involucrado en la virulencia (p. ej. genes asociados al metabolismo). Si bien Stx es el factor de virulencia principal de STEC y el que define este virotipo diarreogénico, la presencia del gen que codifica Stx no necesariamente indica expresión (Gardette *et al.*, 2019; EFSA, 2020). El ambiente en el cual STEC se desarrolla también modifica su expresión génica. Apoyan esta idea trabajos como el realizado por Goswami *et al.*, en el 2015, donde se co-cultivaron cepas O157: H7 con *E. coli* comensales y esto produjo un aumento en la producción de Stx2 y así la virulencia de las cepas O157: H7 en ratones, lo que sugiere que hay un efecto sinérgico con la microbiota intestinal.

Las infecciones por STEC ocurren a cualquier edad; sin embargo, en niños menores de cinco años pueden producir infecciones leves, asintomáticas, diarrea acuosa y diarrea con sangre (DS) o procesos más severos como colitis hemorrágica (CH) o síndrome urémico hemolítico (SUH), el cual puede ser mortal en la etapa aguda o dejar secuelas a largo plazo que requieren diálisis crónica (20% de los niños) o trasplante renal. El resultado de esta interacción no depende únicamente de los factores de virulencia presentes en STEC, sino que también depende de factores humanos. La edad se asocia con un mayor riesgo de infección grave por

STEC, como fue el caso de una familia en Finlandia, donde en cinco miembros se aisló una cepa O78:H- positiva para *stx1c* y *eae*. Los padres y los hermanos mayores no presentaron síntomas, en cambio el niño de 2 años desarrolló SUH (Lienemann *et al.*, 2012). El SUH es la primera causa de insuficiencia renal aguda en niños pequeños. En adultos, la complicación se presenta en forma de púrpura trombótico trombocitopénico (PTT) ya que el compromiso vascular renal es casi nulo en este grupo etario (Nataro *et al.*, 1998; Kaper *et al.*, 2004). Un estudio retrospectivo realizado en Japón en el año 2016 por el grupo de Fuji y colaboradores, indicó que las mujeres adultas (mayores de 20 años) eran significativamente más propensas a desarrollar SUH que los hombres adultos, y lo asoció con una mayor cantidad del receptor Gb3 detectado en los túbulos renales distales y colectores en las mujeres (Fujii *et al.*, 2016). Estos ejemplos sugieren que la genética humana y la susceptibilidad individual incluida la inmunosupresión, el género, la edad y las enfermedades subyacente pueden afectar en gran medida el resultado de la enfermedad.

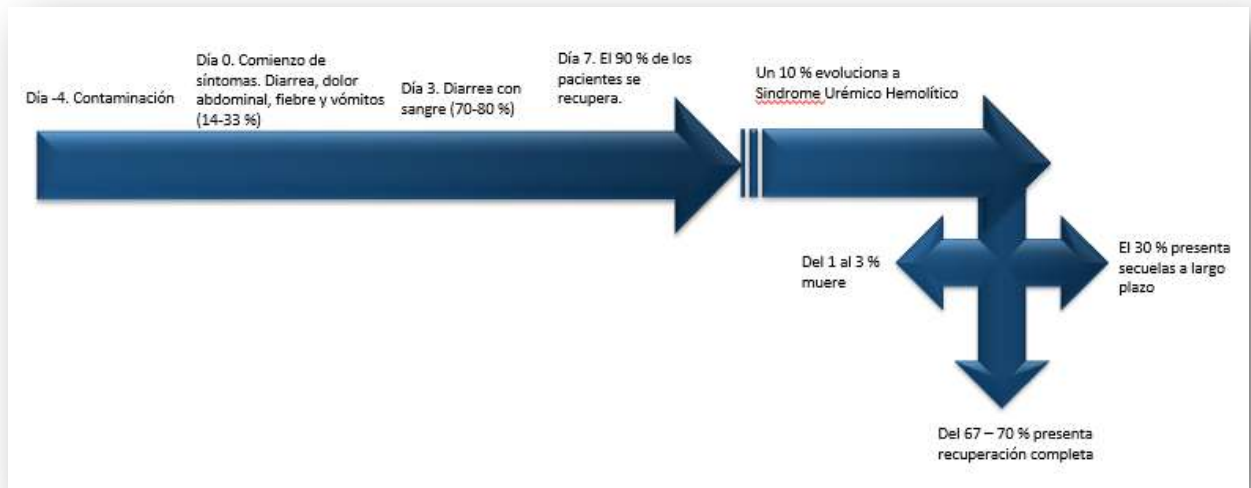
Por otra parte, algunas cepas de STEC definidas como heteropatógenas (portadoras de genes de DEC y ExPEC como *femA* y otros del virotipo UPEC) pueden ser responsables de casos de infecciones del tracto urinario (ITU), sobre todo en sujetos añosos con factores predisponentes evidentes (Karmali *et al.*, 2003; Gadea *et al.*, 2012; Rivas *et al.*, 2016). Algunos de estos individuos pueden desarrollar SUH.

Se estima que STEC produce alrededor de 3 millones de enfermedades agudas al año y conducen a casi 4000 casos de SUH (Majowicz *et al.*, 2014; Joseph *et al.*, 2020). A su vez STEC O157:H7, sería responsable de un millón de casos de diarrea y cerca de 2000 casos de SUH al año en todo el mundo (Majowicz *et al.*, 2014; Joseph *et al.*, 2020)

Evolución cronológica de la infección

Las infecciones producidas por STEC presentan una amplia gama de gravedad, desde portadores asintomáticos sin ninguna manifestación clínica, hasta personas que fallecen a causa de SUH. Es importante una rápida asociación de los síntomas de DS, CH o SUH con una posible infección por STEC, a los efectos de proporcionar un tratamiento médico adecuado y también con el fin de adoptar medidas epidemiológicas tendientes a indentificar otros casos y a encontrar la fuente de contaminación para evitar su diseminación masiva. Sin embargo, las presentaciones clínicas son engañosas y difieren mucho con la edad del paciente, principalmente en adultos, lo que conduce a un sub-diagnóstico y también a cometer errores en los tratamientos médicos indicados (Clogher *et al.*, 2012; Joseph *et al.*, 2020).

La evolución cronológica más común en niños pequeños se presenta en el esquema 1. Como puede observarse la infección por STEC se produce 3 o 4 días antes del inicio de los síntomas. En el día 1 comienzan síntomas inespecíficos como el dolor abdominal, diarrea sin sangre, fiebre y vómitos que se observan en el 14 al 33% de los pacientes. El tercer día aparece la diarrea sanguinolenta, la cual se evidencia en el 70 a 80% de los pacientes. En el día siete, mientras que el 90% de los pacientes evoluciona favorablemente y se recuperan sin secuelas, el 10% evoluciona a Síndrome Urémico Hemolítico. De estos, el 67 a 70% se recupera completamente mientras que el 30% presenta secuelas a largo plazo que como ya hemos mencionado requiere diálisis o trasplante renal y del 1 al 3% muere.



Esquema 1. Evolución cronológica de la infección por STEC (adaptado de Farfán *et al.*, 2016; Joseph *et al.*, 2020).

En Uruguay ocurren entre 10-15 casos de SUH por año, por lo tanto, habría entre 100-150 infecciones por STEC anuales (Varela *et al.*, 2008; Varela *et al.*, 2015).

Reservorios Naturales y Vías de Transmisión de STEC

Los rumiantes, especialmente el ganado bovino, constituyen el principal reservorio de STEC en general y de las cepas O157:H7 en particular. Los animales adultos son en general portadores asintomáticos de estos gérmenes, pero los más jóvenes incluyendo: terneros post-destete pueden padecer enfermedad que afecta su desarrollo (Nataro *et al.*, 1998; Pistone *et al.*, 2005; Joseph *et al.*, 2020) (ver imagen 6).

El ganado ovino también se considera reservorio de STEC, aunque con menor tasa de prevalencia. En algunos países como Australia las ovejas tienen una mayor importancia como reservorio de este patógeno (Parma *et al.*, 2000; Gyles *et al.*, 2007; CDC, 2008; Joseph *et al.*, 2020).

La transmisión a los seres humanos de estos agentes ocurre por la vía fecal-oral y se produce de formas diferentes: por contacto directo con animales contaminados, por el contacto directo entre personas, o indirecta por la ingestión de alimentos o agua contaminada con heces (Terajima *et al.*, 2017).

También se han aislado cepas STEC de animales domésticos sanos como cabras, gatos y perros, hallando una prevalencia del 13.8% en gatos y 4.8% de perros en Dinamarca (Beutin *et al.* 1993), y 4.0% en perros y 4.2% en gatos en Argentina (Gallego *et al.* 2006; Bentancor, 2006). También se han aislado a partir de gaviotas, conejos y pollos.



Imagen 6. Vías de transmisión de STEC (imágenes tomadas de <https://pixabay.com/es/>).

Con respecto a la transmisión de STEC por el consumo de alimentos, hasta hace unos años se atribuía principalmente al consumo de carne de res molida contaminada, principalmente hamburguesas. Un ejemplo lo constituye un gran brote que se reportó en el año 1999,

causado por O157:H7 (Tuttle *et al.*, 1999). Argentina, donde el SUH es endémico, ha realizado extensos trabajos con las carnicerías por medio de políticas gubernamentales. El Programa Carnicerías Saludables, desarrollado por investigadores de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata (UNLP), logró reducir el riesgo de contaminación por *Escherichia coli*, *Salmonella* y *Listeria* en más de 3.500 carnicerías de 180 municipios de la Argentina (Leotta *et al.*, 2014).

Los brotes más recientes se han asociado con productos lácteos crudos, espinacas, agua potable o coles (Salvatori *et al.*, 2009; Buchholz *et al.*, 2011; Joseph *et al.*, 2020).

Con respecto a las otras vías de transmisión de STEC, en un análisis retrospectivo de 350 brotes en los EE. UU entre 1982 y 2002, Rangel *et al.* encontraron que el 52% de los brotes fueron transmitidos por alimentos: 21% por consumo de carne molida, el 14% resultó de transmisión de persona a persona, mientras que en el 6% de los casos el agua de recreación fue la vía de transmisión. No es menor el dato de que en el 21% de los casos no se pudo determinar la vía de transmisión y el alimento implicado (Rangel *et al.*, 2005; Joseph *et al.*, 2020).

En Europa en el período 2010-2017 los alimentos más frecuentemente relacionados con brotes de STEC fueron en orden descendiente, carne bovina, seguido de vegetales, jugos, leche y quesos (EFSA y ECDC 2019).

En lo que respecta a la transmisión alimentaria, hay que destacar que la importancia de esta vía no depende únicamente de la presencia de STEC en lo consumido, sino que también participan otros factores como los hábitos alimenticios y culinarios, incluyendo conocimientos

de los manipuladores sobre todo relacionados a tiempos y temperaturas de cocción, manejo seguro y también conservación de los alimentos.

Tratamiento para la infección por STEC

No hay tratamiento específico para la infección por STEC en seres humanos, sin embargo, se han desarrollado nuevos enfoques terapéuticos y novedosas estrategias que podrían contribuir a controlar la infección y/o a evitar la enfermedad. Dentro de ellas se encuentran i) la terapia con anticuerpos (dirigidos a Stx, a Intimina, o contra el componente 5 del complemento (C5)); ii) análogos de los receptores de toxinas Shiga, lo cual provocarían una interferencia de la unión y captación intracelular de Stx, así como inhibición de su dirección intracelular temprana al aparato de Golgi y el retículo endoplásmico. Una de esas sustancias es la cloroquina, una base débil que puede difundirse a través de las membranas y acumularse en los compartimentos ácidos; iii) terapia con fagos, por aplicación de fagos líticos para matar y disminuir el número de patógenos en alimentos, reservorios animales o pacientes (Mühlen y Dersch, 2020).

El uso de algunos antibióticos durante la fase diarreica de la infección no está recomendado, o por lo menos no hay acuerdo entre los expertos, ya que podría aumentar las chances de desarrollar complicaciones severas como SUH o PPT al inducir la expresión de Stx (Wong *et al.*, 2000). Algunos antibióticos usados en terapia humana o en la alimentación animal como promotores de crecimiento pueden estimular la inducción de los fagos como por ejemplo las quinolonas, la ciprofloxacina o el trimethoprim-sulfametoxazol (Kimmitt *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2000). Según los trabajos reportados por Krüger y Lucchesi en el 2011, ciertos agentes externos, como la radiación con luz UV o la exposición a mitomicina C, pueden inducir el ciclo lítico a través de la activación del sistema SOS. Se ha encontrado también que estos fagos

podrían ser inducidos por compuestos quelantes, a través de mecanismos independientes a la respuesta SOS (Imamovic y Muniesa, 2012).

Los intentos de controlar las infecciones por STEC en los seres humanos se centran fundamentalmente, en buscar la disminución de la contaminación de las carcasas con heces, lo cual se produce principalmente en la faena, esto se lograría disminuyendo la prevalencia y la excreción de *E. coli* patógenas en el ganado y en sus heces (Colavita, 2012; Grispoldi *et. al*, 2017). En este sentido se puede actuar a diferentes niveles: realizando una limpieza correcta de las carcasas de los animales faenados con agua potable, utilizando algunos desinfectantes permitidos, realizando la faena siguiendo las normas de buenas prácticas de higiene con el Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (HACCP) o utilizando antibióticos previos a la faena para reducir la carga de STEC y de otras bacterias en la microbiota intestinal, entre otros (Loneragan *et al.*, 2005). Sin embargo, algunas de estas medidas presentan inconvenientes potenciales; como por ejemplo el uso indiscriminado de antibióticos en el ámbito veterinario. Esta práctica selecciona cepas bacterianas resistentes que luego podrían transmitirse a los seres humanos. En este sentido es importante desarrollar tecnologías alternativas al uso de antibióticos para evitar el aumento de cepas que presenten diferentes perfiles de resistencia, como ser el agregado de prebióticos en la dieta del animal que conduce a una reducción de la prevalencia de este microorganismo en las heces (Grispoldi *et. al*, 2017).

Otra estrategia más segura y confiable para la prevención de la diseminación de STEC es a través del control de estas bacterias en el reservorio bovino, basada en la inmunización activa de estos animales. Diferentes estructuras de superficie que participan en la adherencia de STEC a los enterocitos se han ensayado como vacunas. En ese sentido, la proteína de membrana externa intimina, codificada por el gen *eae*, ha sido utilizada en modelos murinos

con resultados alentadores (Nart *et al.*, 2008; Victor *et al.*, 2013). Stx podría actuar como un agente inmunomodulador durante las infecciones por STEC en el ganado y es un factor de virulencia presente en todas las cepas de STEC, por lo cual lo convierte en un candidato para el desarrollo de vacunas solo o combinado con otros factores de virulencia (Kerner *et al.*, 2015).

Como se mencionó anteriormente otras estructuras también participan en la adherencia de las cepas STEC a células eucariotas. Las mismas también podrían utilizarse como inmunógenos potenciales para el ganado bovino.

Situación de Uruguay y la región

En Uruguay se estima, como se mencionó anteriormente que ocurren entre 10 y 15 casos nuevos de SUH por año, y la tasa de incidencia es de 4 a 5/100.000 niños menores de 5 años, aproximadamente (Varela *et al.*, 2008; Varela *et al.*, 2015). En los casos de SUH con recuperación del agente predominan los cultivos STEC no O157. El Departamento de Bacteriología y Virología del Instituto de Higiene de la Facultad de Medicina, ha demostrado la presencia de STEC O157:H7 asociado a SUH en una niña de Melo, en pacientes añosos con ITU sin SUH y en carne picada para consumo humano (Gadea *et al.*, 2004; Varela *et al.*, 2008; Gadea *et al.*, 2012; Varela y Schelotto, 2015).

En Argentina, la OPS considera que el SUH es endémico, con 400 casos nuevos por año, es de notificación obligatoria y dispone de un correcto sistema de vigilancia. Presenta una tasa de 6.5/100.000 niños menores de 5 años y entre 12.2 y 14/100.000 niños menores de 1 año; la mayoría producidos por cepas STEC O157:H7 (Melli *et al.*, 2015; Rivas *et al.*, 2006; Oderiz *et al.*, 2018; Joseph *et al.*, 2020). Esta situación representa una diferencia importante con respecto a lo que ocurre en Uruguay en cuanto a la distribución de serotipos STEC asociados

a SUH. Las diferencias observadas con Argentina pueden deberse a varios factores, algunos conocidos y otros no tanto. En Argentina es frecuente el sistema *feed-lot* o engorde intensivo del ganado vacuno a corral, en tanto en Uruguay se hace principalmente a pradera. En aquel tipo de sistemas los animales se alimentan con granos de salvado, cebada o maíz. Esto, junto al estrés del encierro, produce alteraciones en la ecología intestinal del ganado que a su vez favorecería la eliminación de STEC O157 en mayores cantidades y por períodos prolongados. Algunos de estos animales excretan de forma intermitente más de 10^4 UFC/g de heces de O157 y se denominan “*supershedders*” (Callaway *et al.*, 2009).

Otros factores, como relación cabezas de ganado vacuno/habitantes, higiene durante la faena, hábitos culinarios o potencial virulento de las cepas STEC prevalentes, podrían ser responsables de las diferentes incidencias observadas en distintos países. En Uruguay hay una relación alta entre cabezas de ganado y habitantes (12 millones/3,3 millones), similar o incluso mayor a la informada en Argentina; sin embargo, el número de casos de SUH es similar o levemente menor y la distribución de serogrupos es diferente (Gadea *et al.*, 2004; Varela y Schelotto, 2015).

Otro factor podría ser la circulación en Uruguay de cepas STEC O157:H7 diferentes a las prevalentes en Argentina (Amigo *et al.*, 2015).

Detección de STEC

Con respecto a la detección de STEC en diferentes matrices, se han desarrollado una variedad de pruebas de laboratorio basadas en estrategias diferentes que se pueden usar combinadas: enriquecimiento previo de la muestra, cultivos en medios selectivos, medios cromogénicos, etc., utilización de kits basados en reacciones antígeno-anticuerpos y amplificación de ácidos nucleicos (AAN). Sin embargo, el brote de infección por STEC O104:H4 que ocurrió en Alemania en 2011, y que causó 3816 casos incluyendo 845 SUH y 54 muertes, puso de manifiesto las limitaciones de algunas de estas aproximaciones para detectar y controlar la difusión de estos agentes desde su reservorio animal al intestino de los seres humanos (Bielaszewska *et al.*, 2011; Beutin *et al.*, 2012; Joseph *et al.*, 2020).

Clásicamente el diagnóstico de la presencia de este patógeno basado en AAN, ya sea en las muestras clínicas, en alimentos y en ganado presentaba el desafío de que se debía asegurar la presencia de los genes *stx* y *eae* para así poder confirmar la presencia de STEC y evaluar la capacidad patogénica de la cepa. Sin embargo, como vimos antes, aparecieron a nivel mundial cepas *stx* positivas y *eae* negativas con la capacidad patogénica definida, por lo cual hoy en día pensar solo en estos dos genes a la hora de realizar un *screening* y evaluación de su potencial para causar daño no es adecuado.

Parece necesario ampliar las secuencias blanco a estudiar (llegando como extremo al WGS) para realizar un diagnóstico más confiable de la presencia de STEC patógena. En ese sentido algunos países, siguiendo la opinión de expertos incorporaron en 2013 la detección de genes como *aggR* (activador transcripcional), *aaiC* (proteína secretada secretada por EAEC) omo marcadores de potencial patogénico.

Actualmente, algunos expertos sostienen que todas las cepas de STEC son capaces de producir daño en seres humanos, incluyendo enfermedades severas. En esto se basan algunas autoridades sanitarias para rechazar partidas de carne que Uruguay exporta a determinados mercados.

Cabe recordar que los alimentos son matrices complejas y pueden contener por tanto una variedad de STEC. Los estudios locales existentes sobre la distribución y características de los atributos de virulencia típicos (*stx* y *eae*) y de atributos de virulencia adicionales en cepas de STEC O157:H7 y no-O157 aportan datos parciales para la identificación de nuevas secuencias blanco a ser utilizadas en el diagnóstico o para valorar la capacidad patogénica de las cepas STEC circulantes.

El desarrollo y aplicación de diferentes herramientas moleculares han permitido, por un lado, la comparación de cepas STEC de diferentes orígenes; en este sentido se destaca el valor de la recuperación y estudio de las cepas STEC circulantes en una región. Por otra parte, resulta importante establecer una aproximación de laboratorio a la definición de su potencial patogénico para los seres humanos, asumiendo sus limitaciones y cambios que pueden ocurrir con el tiempo. Entre estas herramientas se encuentran la caracterización del tipo de toxina Shiga producida y sus variantes, la tipificación por clados, la determinación del sitio de inserción de genes clásicos de virulencia (bacteriófagos temperados con los genes *stx* e isla de patogenicidad LEE), y la presencia de genes accesorios de virulencia.

Utilizando estas herramientas Manning *et al.* describieron la clona hipervirulenta de STEC O157 responsable del brote del 2006 en USA, asociado al consumo de espinacas crudas (Manning *et al.*, 2008).

Un estudio hecho en Argentina, mostró que la mayoría de las cepas STEC O157:H7 de diferentes orígenes pertenecieron al clado 8, con el profago *stx2* integrado en el sitio *argW* portando varios genes accesorios de virulencia (Mellor *et al.*, 2012).

La electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) y el *multilocus sequence typing* (MLST) se utilizan a menudo para comparar las cepas a nivel molecular. Estas técnicas han sido muy utilizadas en estudios de brotes y en las ETAs (enfermedades transmitidas por alimentos), porque permiten identificar una especie de “huella” molecular de las cepas implicadas y compararlas. También son útiles para saber si una cepa determinada persiste en un establecimiento por largos períodos de tiempo, así como para conocer la variabilidad de las cepas circulantes (Tóth *et al.*, 2009; Braga *et al.*, 2017; Oderiz *et al.*, 2018).

Por otra parte, los estudios genómicos de *E. coli* WGS (del inglés *whole genome sequence*), muestran una amplia diversidad genómica relacionada con las estructuras, posiciones y contenido genético de los bacteriófagos y una importante variabilidad de genes putativos de virulencia. Esto lleva a que la WGS cobre vital importancia en la clasificación de cepas como patógenas y no patógenas, así como en la determinación de nuevos atributos de virulencia, o en la identificación de nuevas secuencias que puedan ser utilizadas como marcadores moleculares adicionales en el diagnóstico de este patógeno (Thót *et al.*, 2009; Denamur *et al.*, 2020; Touchon *et al.* 2020). También ha resultado de utilidad para la detección de brotes y la vigilancia epidemiológica tal como lo reportan Holmes *et al.*, en el 2015.

El estudio de STEC es relevante por el impacto en la salud pública, ya explicado, y por el impacto económico. Dada la importancia de *E. coli* O157:H7 como productora de casos clínicos de enfermedad gastrointestinal, hospitalización y muerte en seres humanos, este serotipo fue declarado adulterante de productos cárnicos no-intactos por el Departamento

de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) en el año 1994. Más tarde, en Setiembre de 2011, seis serogrupos STEC, O26, O45, O103, O111, O121 y O145 fueron también declarados adulterantes de productos cárnicos debido al elevado numero de casos en los Estados Unidos asociados a estos serogrupos STEC no-O157 (USDA, 2021).

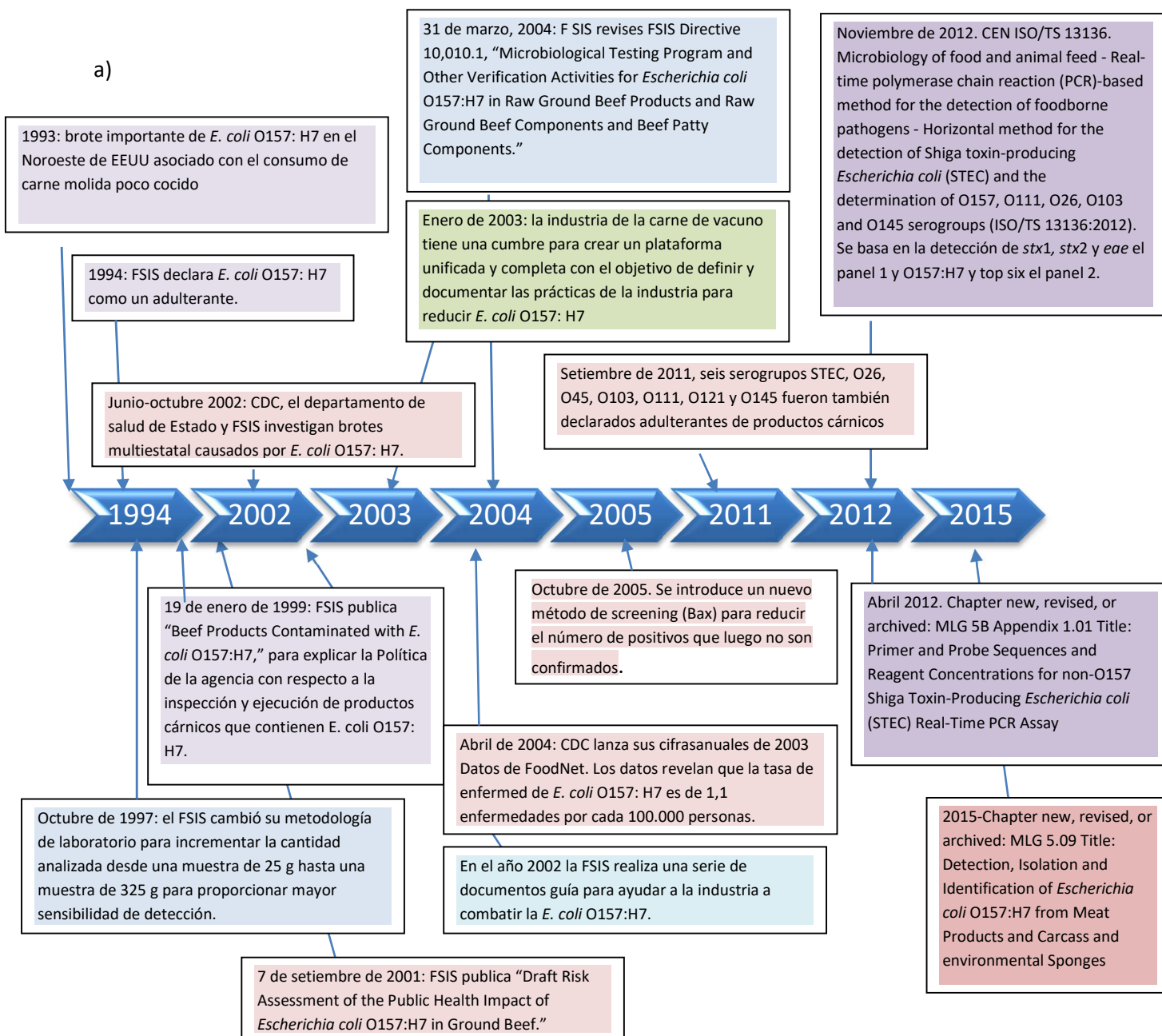
La presencia de STEC en carne para consumo humano se considera por tanto, peligrosa para la salud y constituye causa de rechazo para estos productos exportados a Europa (<https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/?event=searchResultList>) y a EEUU (<https://www.fsis.usda.gov/inspection/import-export/international-reports/import-and-export-data>) quienes son importantes compradores de nuestras carnes y muy exigentes en lo que respecta a requisitos sanitarios.

Mas de 400 mil toneladas peso canal por año son exportadas a mas de 140 mercados entre los que se destacan la Unión Europea, Estados Unidos, Canadá, China, entre otros. Entre junio de 2019 y junio de 2020 esto representó un total de 1.700.000 dólares aproximadamente (INAC, 2020). La exportación de carne en nuestro país representa cerca del 20% de todas las exportaciones de bienes. En los últimos años han ocurrido cambios en los sistemas productivos que modificarían la prevalencia de ciertos microorganismos patógenos que podrían afectar el acceso a mercados, haciendo necesario el uso de nuevos sistemas de monitoreo para conservar y mejorar las condiciones actuales.

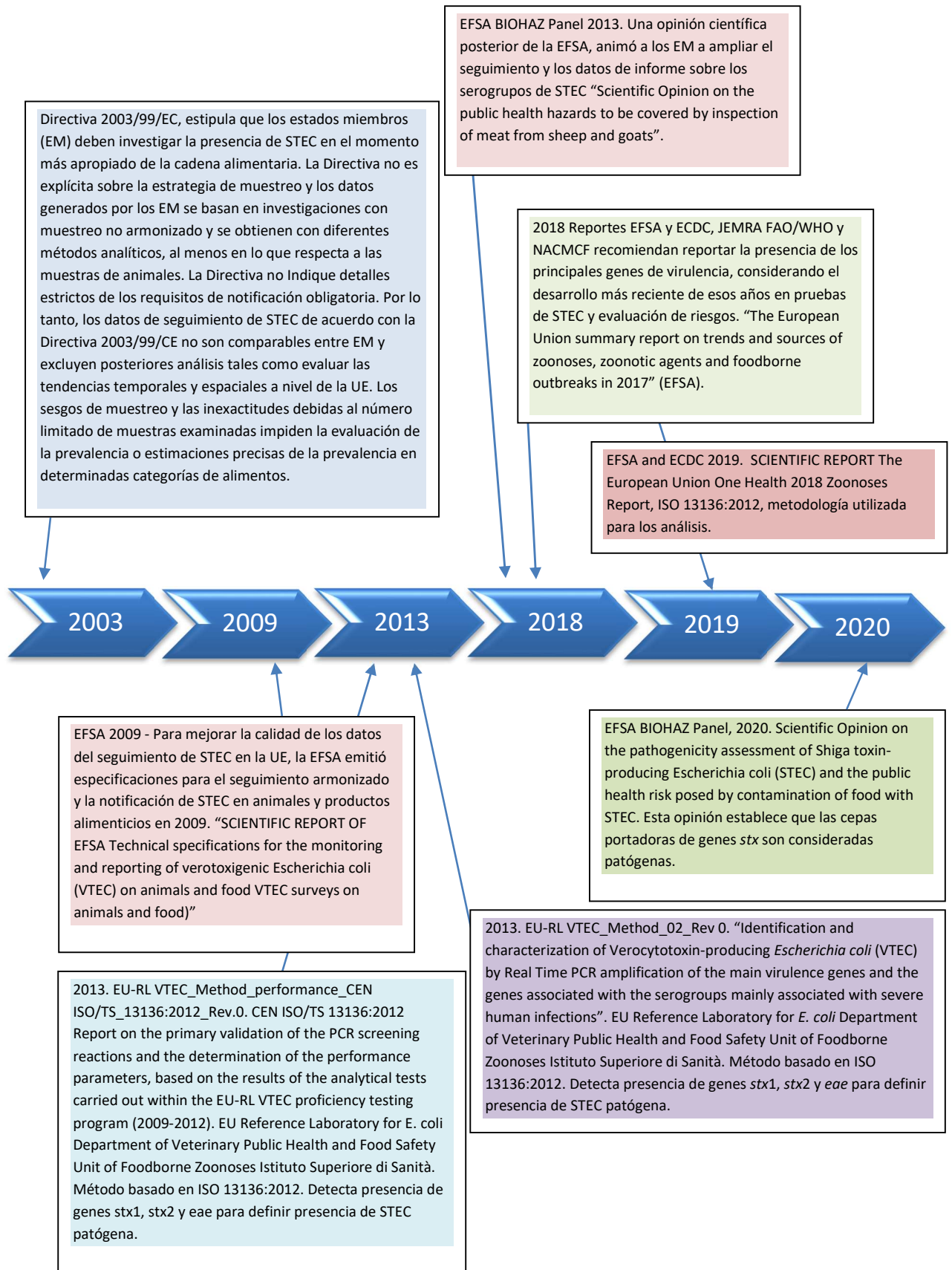
Hay que destacar que las exigencias de los mercados compradores también han ido variando a medida que pasó el tiempo, y avanzó el conocimiento de la biología, patogenia, epidemiología y genómica de las cepas STEC. Por ejemplo, EEUU (que antes solo exigía libre de STEC O157:H7) ahora rechaza un producto si también presenta cepas de *E. coli* portando genes *stx* y *eae* (en los serotipos conocidos como las *big six*: O26, O45, O103, O111, O121 y

O145) mientras que Europa actualmente rechaza la carne con la sola presencia de genes *stx*. En la imagen 7 se presenta una línea de tiempo para dos de nuestros principales mercados, EEUU y Europa para explicar los cambios tanto en lo conceptual como en lo reglamentario y mostrar algunos de los acontecimientos relacionados a estos patógenos.

Imagen 7. Línea de tiempo de los aspectos reglamentarios y conceptuales más importantes relacionados a STEC a) USDA de EEUU (USDA, 2021). b) FSIS de Unión Europea (EFSA 2009; EFSA BIOHAZ Panel, 2013; EFSA and ECDC 2018; EFSA and ECDC 2019; EFSA, 2020).



b)



Hipótesis

Las cepas de *Escherichia coli* productoras de toxina Shiga poseen otros genes aparte de los que definen este virotipo, que pueden ser identificados y utilizados como blancos para apoyar el diagnóstico microbiológico; y de esa forma aportar conocimientos útiles para el control de este tipo de patógenos.

Objetivos generales

Caracterizar un conjunto de cepas de *Escherichia coli* productoras de toxina Shiga (O157 y no-O157) aisladas de alimentos, bovinos y casos clínicos en nuestro país entre el 2005 y el 2017. Colaborar en la generación de una base de datos nacional de este patógeno. Identificar nuevas secuencias genéticas “blanco” que ayuden a la detección y el control de este patógeno.

Objetivos específicos

Completar la caracterización bioquímica de un conjunto de cepas STEC pertenecientes al banco de cepas del Departamento de Bacteriología y Virología del Instituto de Higiene de la Facultad de Medicina, más las aisladas en el transcurso del doctorado (57 en total).

Realizar la confirmación del serogrupo/serotipo.

Genotipificar las cepas por Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE).

Realizar MLST a un grupo seleccionado de cepas.

Conocer las variantes de los genes *stx*.

Establecer las variantes de los genes *eae*.

Buscar la presencia de otros genes implicados en la virulencia, principalmente genes relacionados a la adherencia bacteriana a células eucariotas.

Buscar los sitios de inserción de la isla de patogenicidad LEE.

Determinar los clados de virulencia a los que pertenecen las cepas O157:H7.

Determinar los perfiles de resistencia a antibióticos.

Buscar marcadores moleculares que aporten a un nuevo abordaje en diagnóstico.

Realizar la validación de los genes candidatos a ser utilizados como marcadores moleculares.

Realizar la secuenciación genómica completa y el ensamblado de un conjunto seleccionado de cepas.

Buscar la presencia de los genes candidatos en los genomas ensamblados de cepas locales.

Buscar genes relacionados a resistencia antimicrobiana en los genomas ensamblados de cepas locales.

CAPÍTULO 1

CAPÍTULO 1. Caracterización bioquímica, confirmación del serotipo/serogrupo y caracterización genómica (PGFE y MLST) de las cepas en estudio

El objetivo del presente capítulo fue realizar la caracterización de 50 cepas locales de *Escherichia coli* productoras de toxina Shiga aisladas de alimentos, bovinos y casos clínicos, y 7 cepas provenientes de controles interlaboratorio o cepas de colección (n=57).

Los aislamientos y la caracterización bioquímica se realizaron por técnicas microbiológicas clásicas, y se confirmó el serogrupo/serotipo por PCR para el caso de O157. Para las no-O157, se usaron sueros preparados localmente y fueron reconfirmadas en México. Las cepas fueron genotipificadas por Electroforesis de Campo Pulsado (PFGE) lo cual proporciona una base de pulsotipos de cepas locales de STEC. Ante la sospecha de brote de ETA se podría buscar la relación del pulsotipo implicado de la cepa problema con el posible origen de la misma por comparación de los perfiles y de esta forma analizar si la cepa problema ya fue identificada en alimentos, para tener una idea del posible alimento involucrado. La PFGE nos permitirá ver cambios a nivel genético de las cepas a corto plazo. Sumados estos resultados a los obtenidos por *Multilocus Sequence Typing* (MLST), podremos determinar su distribución filogenética y estructura poblacional, así como tener una idea de la diversidad genética asociada a este patógeno y de la relación clonal entre los aislamientos.

Metodología

Cepas

Se analizaron aislamientos STEC O157 y no-O157 obtenidos entre 2005 y 2017 a partir de seres humanos, bovinos y alimentos, conservados en el cepario del Departamento de Bacteriología y Virología. Los únicos datos que se utilizaron para el análisis final fueron: origen del aislamiento, serogrupo/serotipo y cuadro clínico para el caso de cepas de origen humano.

Aislamientos

En el marco de la tesis se realizaron aislamientos de muestras clínicas de pacientes (principalmente niños), sospechosos de padecer Síndrome Urémico Hemolítico (SUH). Se procesaron entre el 2018 y el 2020, 12 muestras de heces, y se recuperaron dos cepas, una del serogrupo O111 incluida en esta tesis y una del serogrupo O26 no incluida, según procedimientos previamente descritos en el laboratorio (Varela *et. al*, 2008). Brevemente, para la búsqueda de STEC, las muestras de heces se sembraron directamente en placas de agar MacConkey lactosa, agar MacConkey sorbitol (SMAC) (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, UK) y en caldo digerido tríptico de soja (TSB) (Becton Dickinson France S.A.S., Le Pont de Claix, France) suplementado con 50 µg/L de cefixima y 2,5 mg/L de telurito de potasio (bioMérieux Marcy/Étoile, France) (CT-TSB), seguido del aislamiento en placas de SMAC luego de 6 horas de incubación a 37°C. Para la extracción de ADN se resuspendió una ansada de la zona de crecimiento confluyente de cada una de las placas de SMAC en agua ultrapura Milli-Q, se calentó a 100°C durante 10 minutos y luego se centrifugó a 13.000 rpm durante 5 minutos. El mismo procedimiento de extracción se realizó a partir de mezclas de colonias sorbitol positivas y negativas a los efectos de identificar colonias sospechosas. Por niño estudiado se

analizaron entre 30 y 50 colonias. Posteriormente se realizó amplificación para los genes *stx* según los procedimientos descritos más adelante en esta tesis. En caso de obtenerse resultados positivos, se reestudiaron las colonias individuales, para identificar y conservar los cultivos positivos.

Extracción de ADN

Para la extracción de ADN de los aislamientos puros, los mismos se sembraron en placas de agar TSA y 5 colonias se resuspendieron en 150 μ L de agua MQ, la suspensión se calentó a 100°C durante 10 minutos, se enfrió hasta 4°C y luego se centrifugó a 13.000 rpm durante 5 minutos.

Se utilizaron 2,5 μ L del sobrenadante como ADN molde en las distintas reacciones de amplificación llevadas a cabo (Varela *et. al*, 2008; Varela y Schelotto, 2015).

Caracterización Bioquímica

Para establecer el biotipo de las cepas STEC O157:H7 se realizaron las siguientes pruebas bioquímicas: producción de ácido a partir de dulcitol, rafinosa, sorbitol y ramnosa; y de lisina-decarboxilasa siguiendo procedimientos estándares (Ewing, 2005). Para la identificación del resto se realizó API 20 E.

Detección del serogrupo/serotipo

La detección del serogrupo se realizó por PCR o por aglutinación en lámina y confirmación en tubo según lo acordado con el Prof. Armando Navarro, UNAM, México.

La serotipificación por aglutinación se realizó según el procedimiento descrito por Orskov y Orskov (1984). Se emplearon sueros específicos anti-O y anti-H para 174 antígenos somáticos y 56 flagelares.

Electroforesis en Gel de Campo Pulsado

La Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE) se realizó siguiendo el protocolo estandarizado por PulseNet (<http://www.cdc.gov/pulsenet/pathogens/index.html>) para *E. coli* O157:H7 (Ribot *et al.*, 2006). Los ensayos fueron llevados a cabo en el Departamento de Bacteriología y Virología del Instituto de Higiene. Para el análisis de similitud se utilizó el programa Bionumerics, habiéndose determinado los pulsogrupos (más de 80% de homología) y los pulsotipos presentes (más de 95% de homología).

MLST

Se realizó MLST a un grupo seleccionado de cepas, entre las que se incluyeron los casos clínicos (7 cepas) y las cepas de O157 caracterizadas como pertenecientes al clado 8 (3 cepas), ya que junto al clado 2, son los clados mayormente asociados a enfermedad en humanos (CDC, 1993; CDC, 2006; FDA, 2007; Manning *et al.*, 2008).

MLST se realizó acorde al procedimiento definido para *E. coli* en el sitio web (<http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli>) utilizando cebadores para regiones internas de siete genes *housekeeping* (*adk*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA*, and *recA*). Las secuencias y las condiciones de ciclado se presentan en el anexo I. Los amplicones producto de la reacción de PCR fueron purificados con el kit de purificación QIAquick PCR (Qiagen). La concentración y calidad del ADN fue evaluada con un espectrofotómetro Nanodrop 2000 UV (Thermo Fisher

Scientific). Posteriormente se enviaron los fragmentos obtenidos al Instituto Pasteur de Montevideo para su secuenciación.

Las secuencias fueron analizadas utilizando el programa Chromas 2.6.6 (Technelysium, Australia).

Debido a problemas en la calidad de las secuencias obtenidas del MLST, se decidió secuenciar completamente los 10 aislamientos (ver capítulo 5) y a partir de los genomas ensamblados realizar el MLST.

Los genomas se analizaron en <https://pathogen.watch/> , que asigna los secuenciotipos utilizando los datos de Enterobase (<http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli>) y del Instituto Pasteur de Francia (<http://bigsdB.web.pasteur.fr/ecoli/>).

Posteriormente se realizaron análisis BURST (del inglés *Based Upon Related Sequence Types* (con 5 o mas *matches* y el esquema de Atchman (Atchman M., 2008)), a partir de los perfiles ST determinados en la página PubMLST, (https://pubmlst.org/bigsdB?db=pubmlst_escherichia_seqdef&page=profiles). BURST es un algoritmo de agrupación novedoso diseñado para su uso con datos de MLST microbianos, desarrollado por Ed Feil (Universidad de Bath). El algoritmo evalúa la distancia genética entre cepas utilizando una matriz de distancias por pares basada en perfiles alélicos. El principio del agrupamiento BURST es combinar cepas con un número limitado de desajustes en los perfiles alélicos en un complejo clonal (Feil *et al.*, 2004) .

Resultados y Discusión

Caracterización Bioquímica, serogrupos/serotipos

En la tabla 1 se presenta el conjunto de aislamientos objeto del presente trabajo. Los mismos corresponden a todos los cultivos O157 enviados a nuestro laboratorio para su confirmación y los cultivos recuperados de casos de SUH enviados para búsqueda de STEC. En la misma se detalla: el año de aislamiento, el origen de los mismos (alimento, ganado, caso clínico, cepas de referencia o control), así como el serotipo correspondiente. Del total de los aislamientos analizadas, 50 corresponden a cepas locales de STEC, uno corresponde a un control interlaboratorio, seis son cepas de colección, y se utilizó un control negativo (cepa 22, que no corresponde a *E. coli*). De los 50 aislamientos locales, 39 provienen de alimentos (carne), cuatro son de origen bovino y siete son de origen clínico (gráfico 1).



Gráfico 1. Origen de los aislamientos estudiados, se informa el % con respecto a las cepas locales (N=50).

Tabla 1. Cepas estudiadas (n=57), origen, año de aislamiento y serotipo correspondiente.

Código de aislamiento	Origen	Año de aislamiento	Serotipo/Serogrupo
1	Alimentos	2012	O157:H7
2	Alimentos	2014	O157:H7
3	Alimentos	2013	O157:H7
4	Alimentos	2015	O157:H7
6	Alimentos	2013	O157:H7
7	Alimentos	2012	O157:H7
8	Alimentos	2014	O157:H7
9	Alimentos	2013	O157:H7
10	Alimentos	2013	O157:H7
12	Alimentos	2013	O157:H7
13	Alimentos	2013	O157:H7
14	Alimentos	2013	O157:H7
15	Alimentos	2014	O157:H7
16	Alimentos	2014	O157:H7
17	Alimentos	2014	O157:H7
18	Alimentos	2014	O157:H7
19	Alimentos	2013	O157:H7
20	Alimentos	2012	O157:H7
21	Hamburguesa	2011	O157:H7
23	Alimentos	2011	O157:H7
24	Humano (URO)	2011	O157:H7
25	Animal	2011	O157:H7
27	Alimentos	2012	O157
28	Alimentos	2012	O157:H7
29	Alimentos	2012	O157
30	Alimentos	2013	O157:H7
31	Alimentos	2013	O157:H7
34	Alimentos	2016	O157:H7
35	control interlaboratorio	2016	O157:H7
36	Alimentos	2016	O157:H7
39	Alimento carne picada	2008	O157:H7
40	Alimento	2008	O157:H7
41	Alimento carne picada	2005	O157:H7
42	Alimentos		O157:H7
43	Alimentos	2010	O157:H7
44	Cuero Ganado	2010	O157:H7
45	Alimentos	2009	O157:H7
46	Carne	2009	O157:H7
47	Carne	2009	O157:H7
48	Carne	2010	O157:H7
49	Alimentos	2017	O157:H7
50	Humano (síndrome urémico hemolítico niño)	2017	O145
51	Alimentos	2017	O157:H7
52	Humano (síndrome urémico hemolítico)	2013	O145
54	Humano (síndrome urémico hemolítico)	2013	O26
56	Alimentos	2012	O103
59	MALBRAN cepa colección	2011	O145

60	Humano (diarrea con sangre)	2009	O26:H11
61	Humano (diarrea con sangre)	2009	O153:HNT
62	UNAM 2015 cepa colección	2015	O145
63	UNAM cepa de colección	2015	O26:H11
64	UNAM cepa de colección	2015	O103 H2
65	UNAM cepa colección	2015	O111 :H8
66	UNAM cepa colección	2015	O121:H19
67	Ganado	2010	O26
68	Ganado	2010	O26
69	Humana (síndrome urémico hemolítico)	2017	O111

La siguiente discriminación en serogrupos/serotipos corresponde a las cepas STEC estudiadas recuperadas localmente (n=50) (gráfico 2a). 41 aislamientos pertenecieron al serogrupo O157, 39 de estas al serotipo O157:H7 (95.1% de los aislamientos estudiados fueron O157), mientras que 9 cepas correspondieron a serotipos no-O157, entre los que se estudiaron O145 (2), O26 (4, una de las cuales fue O26:H11), O103 (1), O153 (1), O111 (1) (gráfico 2b). El serotipo más frecuente en alimentos correspondió a O157:H7 (36 de 39). Cabe destacar que hasta hace unos años era el serotipo relacionado con enfermedad en humanos, por lo cual era el serotipo buscado por los laboratorios que se encargaban del análisis de alimentos (ver línea del tiempo más arriba); esto lleva a que estos datos presenten un importante sesgo y no puedan tomarse como la distribución a nivel país. Este sesgo también se relaciona con las exigencias sanitarias en los lugares a donde se exportaba carne uruguaya, además de la metodología y otras variables de análisis. Ahora que los procedimientos de laboratorio abarcan la detección de “todas” las cepas STEC aparecen otros serogrupos/serotipos reportados en carne bovina uruguaya (portal RASFF, <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/?event=searchResultList> y portal <https://www.fsis.usda.gov/recalls>).

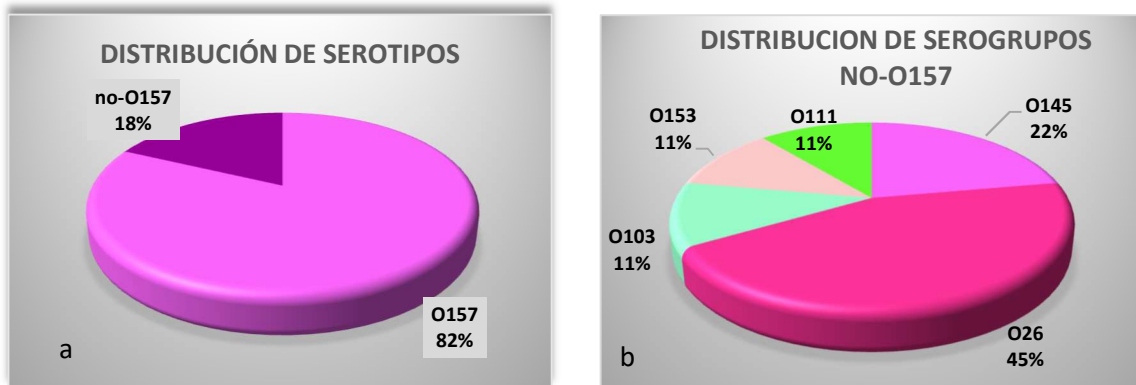


Gráfico 2. a) Distribución de serotipos de cepas locales estudiadas, se informa % con respecto al total (N=50) b) Distribución de serogrupos en las cepas locales no-O157, se informa % respecto al total del grupo (N=9).

Con respecto a los serogrupos/serotipos presentes en los casos clínicos estudiados en esta tesis correspondieron a: O157:H7 (uno de un caso de ITU), O145 (dos de dos casos de SUH), O26 (uno de un caso de SUH), O26:H11 (uno de un niño con diarrea sangrinolienta), O153:HNT (uno de un niño con diarrea), O111 (uno de un niño con SUH) (gráfico 3).

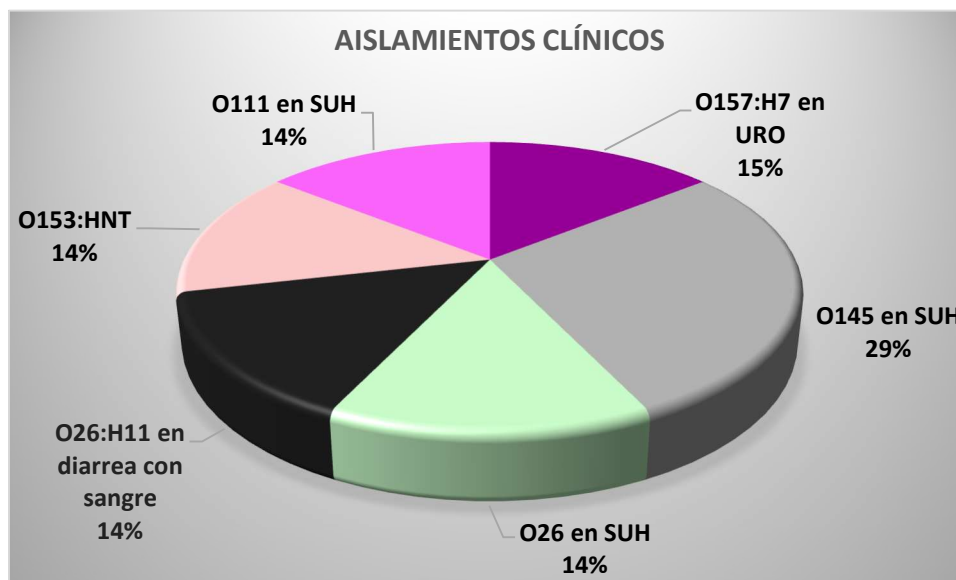


Gráfico 3. Distribución de serotipos de cepas locales estudiadas obtenidas de casos clínicos, se informa % respecto al total del grupo (N=7).

Electroforesis en Gel de Campo Pulsado

En la imagen 8 se muestra un perfil de campo pulsado de las cepas N° 39 a N° 48, a modo ilustrativo de los resultados que se obtuvieron con esta técnica. En los carriles 1 y 12 se observa el patrón de bandas que se obtiene para *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Braenderup, utilizada para normalizar el proceso. Los carriles 2 a 11 corresponden a las cepas 39 a 48 respectivamente.

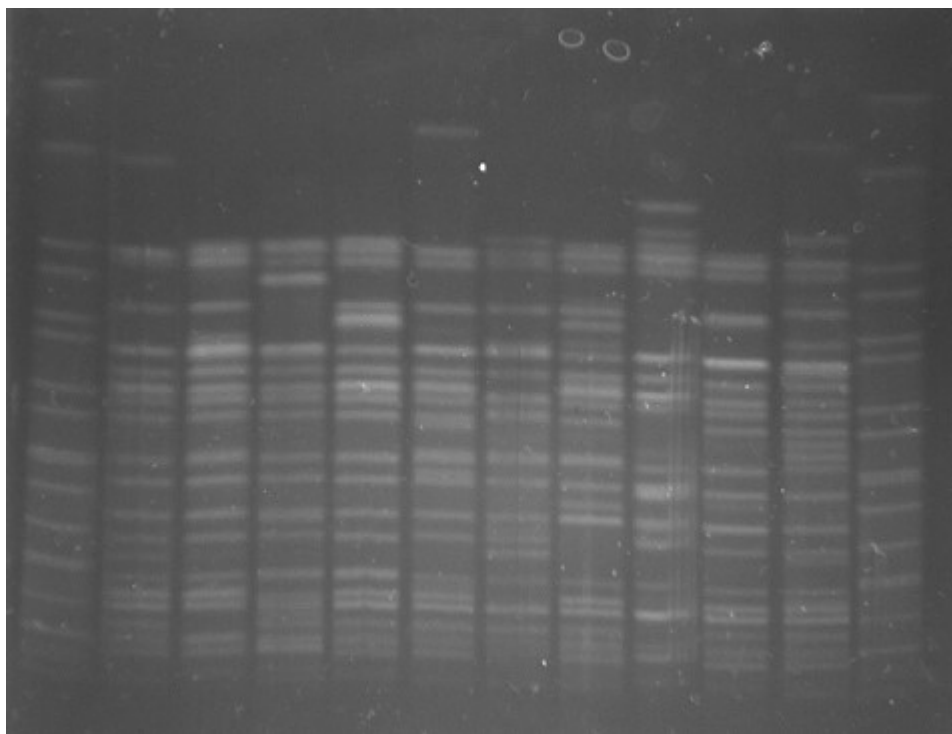


Imagen 8. Perfil de Electroforesis en Gel de Campo Pulsado de las cepas 39 a 48 (carriles 2 a 11), y de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Braenderup (carriles 1 y 12).

En la imagen 9 se presenta el dendograma de las cepas STEC O157 y no O157, donde se observan siete pulsogrupos (definidos por una similitud $\geq 80\%$). Desde arriba hacia abajo, el primer pulsogrupos contiene a la mayoría de las cepas ($n=32$). Dentro de este hay aislamientos de alimentos y de ganado, todos pertenecientes al serogrupo O157. A su vez dentro de este pulsogrupos hay tres pulsotipos (similitud mayor al 95%), con 2 o más aislamientos. Uno de ellos contiene 3 aislamientos (cepas N° 42, 47 y 40), otro contiene 5 aislamientos (cepas N° 19,

20, 14, 8 y 23) de los años 2011, 2012, 2013 y 2014, algunos con identidades de hasta un 100%, lo que nos indica la presencia de variantes circulantes por algún período de tiempo. En el tercer pulsotipo se ubican dos de los aislamientos correspondientes al clado 8 (cepas N° 2 y 4, obtenidas en los años 2014 y 2015, ambas de alimentos) (A en el dendograma). En el segundo pulsogrupos que contiene 3 aislamientos, están ubicadas dos cepas O157 aisladas en 2010 y 2014 y un tercer aislamiento del 2017 proveniente de SUH (cepas 69- serotipo O111), que presenta 81% de similitud con las anteriores (B en el dendograma). En el tercer pulsogrupos se encuentra una cepa control de O157 que se asocia con un 85.7% de homología con un aislamiento O111 (C en el dendograma). En el cuarto pulsogrupos se ubican dos cepas O145 provenientes de SUH, aisladas en los años 2013 y 2017 (cepas 50 y 52) (D en el dendograma). Asociadas a estas dos últimas cepas, con un 76.2% de homología, encontramos la cepa 29 (clado 8). Posteriormente se observa una cepa que no aparece dentro de ningún pulsogrupos, la cepa 46. En el quinto pulsogrupos se encuentran tres cepas, dos provenientes de seres humanos (una de SUH, *E. coli* 54 del 2013, y otra de humanos *E. coli* 60 del 2009), que se asocian con una homología del 86.7%, siendo ambas O26, y una tercera cepa proveniente de ganado, también O26 (*E. coli* 67 del año 2010), que presenta un 80% de homología con las anteriores (E en el dendograma). Luego aparece una cepa no asociada a otros pulsotipos o pulsogrupos que es un aislamiento O26 (*E. coli* 65), que presenta una homología con las anteriores del 74.1%. En el pulsogrupos seis se ubican dos cepas con un 83.3% de homología, una es la *E. coli* 61 proveniente de humano (O153) y una cepa de colección (*E. coli* 63, O26) (F en el dendograma). En el séptimo pulsogrupos se encuentran dos cepas O103, que se asocian con un 86.7% de homología, una es una cepa de colección (*E. coli* 64) y la otra proviene de alimentos (*E. coli* 56) (G en el dendograma).

La mayoría de los aislamientos de origen humano analizados en esta tesis (presentes en el Banco del Laboratorio de Bacteriología) no correspondieron al serotipo O157. Se observa una rama con un 74% de identidad que nuclea tres cepas humanas y dos de ganado, todas ellas O26. Las cepas O145 se presentaron agrupadas, pero no asociadas con la cepa O145 de referencia. La cepa O157 proveniente de humanos se asoció con el pulsogruppo de PFGE que reúne la mayoría de las cepas O157, y presentó un 85.7% de identidad con una cepa recuperada de hamburguesas.

La asociación de dos de los aislamientos del clado 8 en un pulsotipo diferente a las demás cepas O157, apoya la hipótesis de Manning (Manning *et al.*, 2008) que sostiene que el mismo es un clado emergente con características a nivel genético diferentes a los demás clados circulantes, lo cual podría estar relacionado al hecho de que se presentan como cepas con alta asociación a enfermedad severa en humanos. El tercer aislamiento clado ocho encontrado presentó una alta similitud con dos aislamientos humanos lo cual apoya este hecho.

En este grupo analizado (n=41), las cepas O157 del clado 8 representaron el 4,8% de total . Teniendo en cuenta la distribución de los serotipos STEC asociados a SUH en Uruguay, y la presencia de STEC O157 en carne picada bovina para consumo humano y otros alimentos de ese origen, podemos pensar que la mayoría de las cepas STEC O157 recuperadas de alimentos o de seres humanos (2 de ITU, una analizada en esta tesis) en ese período no tendrían un elevado poder patógeno. De todas formas como vimos antes, el resultado final de la interacción con STEC depende además de factores del hospedero.

En ese sentido, en Europa en 2018 hubo 411 casos de SUH, y los serogrupos mayormente recuperados fueron O26 (36,5%), O157 (28,3%), O145 (7,6%), O80 (6,7%) y O111 (4,0%); mientras que en el 4.0% de los casos el mismo no pudo ser determinando (EFSA, 2019). Obsérvese que los serogrupos coinciden con los recuperados de seres humanos en este conjunto de cepas estudiadas. Este resultado estaría a favor de que otros serogrupos no O157 (O26, O111, O145) serían los responsables de los casos de SUH en Uruguay ya que la mayoría de los cultivos O157 no serían virulentos o hipervirulentos como ocurre con los aislamientos de ganado y de personas en Argentina.

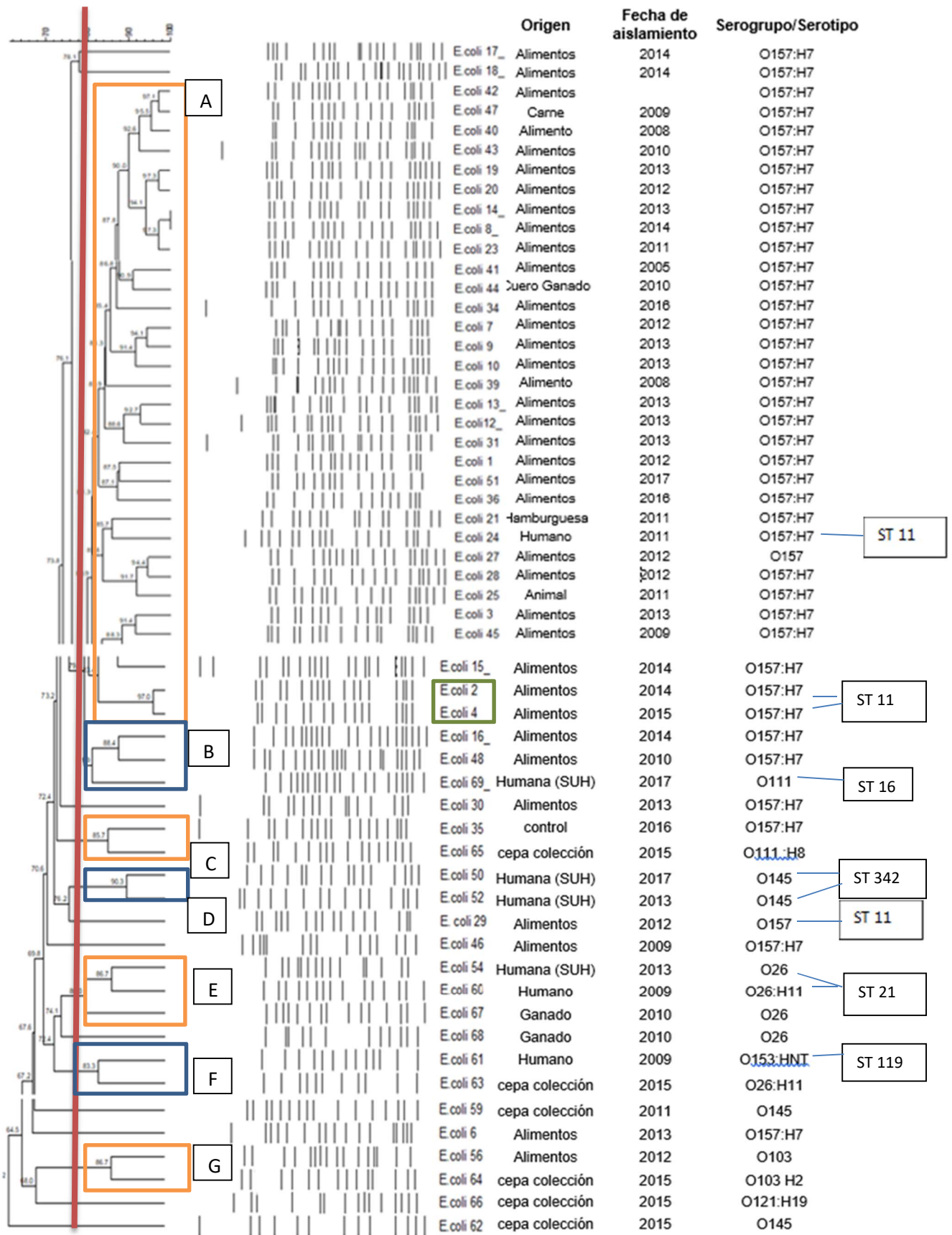


Imagen 9. Dendrograma de las cepas STEC O157 y no O157, donde se detalla la fuente de aislamiento, el año y el serogrupo/serotipo. La línea roja indica el 80% de similitud. El recuadro verde muestra las dos cepas que correspondieron al clado 8 y se asociaron con alta similitud en el dendrograma.

MLST

Se realizaron las PCR para los 7 genes *housekeeping* mencionados, se confirmó por electroforesis en geles de agarosa la presencia de una banda única de ADN amplificado, y de buena calidad de ADN a través de la determinación de las relaciones A260/A280 y A260/A230 por nanodrop. Sin embargo, al enviar el ADN purificado a secuenciar, se obtuvieron secuencias de mala calidad, por lo cual se decidió no continuar estos ensayos.

En las tablas 2 y 3 se presentan los secuenciotipos obtenidos a partir de los genomas completos para los aislamientos evaluados utilizando los datos de Enterobase y del Instituto Pasteur de Francia respectivamente. Los resultados obtenidos en ambas bases fueron concordantes. Todas las cepas O157 ensayadas correspondieron al secuenciotipo 11, que es el secuenciotipo más relacionado a casos clínicos y uno de los predominantes en cepas O157 (Mellmann *et al.*, 2008). Los aislamientos 2, 4 (clado 8, alimentos) y 24 (no clado 8, ITU) se ubicaron en el mismo pulsogrupo en la PFGE, mientras que la cepa 29 se asoció en un pulsogrupo diferente, pero con una similitud del 73 % con las anteriores. Con respecto a los aislamientos no-O157, las cepas 50 y 52 que presentaron el mismo perfil de MLST (342) se asociaron en el mismo pulsotipo de PFGE. Las cepas 54 y 60, ambas O26, presentaron el mismo perfil de MLST y se asociaron en el mismo pulsogrupo de PFGE; ambas fueron secuenciotipo 21, siendo este uno de los secuenciotipos predominantes en estudios de cepas no-O157 provenientes de SUH, reportados por otros autores (Mellmann *et al.*, 2008). Como se mencionó en el punto anterior, la cepa 61 (O153, ST 119) resultó ser similar a las cepas O26 en la PFGE, y la cepa 69 (O111) fue similar a las O157. Esta última correspondió al secuenciotipo 16, el cual también fue reportado como uno de los cinco secuenciotipos más relacionados a casos clínicos en cepas STEC no-O157 (Mellmann *et al.*, 2008). Los resultados

del MLST y de la PFGE son concordantes y apoyan la idea de clonas circulantes que aparecen tanto en ganado, como en los alimentos y en los casos clínicos.

Los análisis Burst realizados mostraron que el ST 119 constituye un singleton, y los secuenciotipos 21 y 16 estarían relacionados en un grupo. Los ST 11 y 342 aparecen como ST fundadores (ver anexo IX).

Tabla 2. Resultados de MLST de los aislamientos evaluados, utilizando datos de Enterobase (Achtman M., 2008).

MLST- Enterobase											
Código de aislamiento	Serogrupo/Serotipo	Año	Perfil							Secuenciotipo	
			<i>adk</i>	<i>fumC</i>	<i>gyrB</i>	<i>lcd</i>	<i>mdh</i>	<i>purA</i>	<i>recA</i>		
2	O157:H7	2014	12	12	8	12	15	2	2		11
4	O157:H7	2015	12	12	8	12	15	2	2		11
29	O157:H7	2012	12	12	8	12	15	2	2		11
24	O157:H7	2011	12	12	8	12	15	2	2		11
50	O145	2017	1	46	69	1	20	34	7		342
52	O145	2013	1	46	69	1	20	34	7		342
54	O26	2013	16	4	12	16	9	7	7		21
60	O26	2009	16	4	12	16	9	7	7		21
61	O153:HNT	2009	48	46	43	45	11	34	35		119
69	O111	2017	6	4	12	16	9	7	12		16

Tabla 3. Resultados de MLST de los aislamientos evaluados, utilizando datos del Instituto Pasteur de Francia.

MLST – Pasteur											
Código de aislamiento	Serogrupo/Serotipo	Año	Perfil								Secuenciotipo
			<i>dinB</i>	<i>icdA</i>	<i>pabB</i>	<i>polB</i>	<i>putP</i>	<i>trpA</i>	<i>trpB</i>	<i>uidA</i>	
2	O157:H7	2014	59	110	88	63	93	84	86	83	628
4	O157:H7	2015	59	110	88	63	93	84	86	83	628
29	O157:H7	2012	59	110	88	63	93	84	86	83	628
24	O157:H7	2011	59	110	88	63	93	84	86	83	628
50	O145	2017	Nuevo	91	193	3	25	31	18	Nuevo	*f929
52	O145	2013	Nuevo	91	193	3	25	31	18	Nuevo	*f929
54	O26	2013	5	3	4	52	84	1	4	66	481
60	O26	2009	5	3	4	52	84	1	4	66	481
61	O153:HNT	2009	11	nuevo	nuevo	52	25	31	18	Nuevo	*8a6b
69	O111	2017	5	3	4	52	95	1	4	66	480

CAPÍTULO 2

CAPÍTULO 2. Estudio de los genes *stx*, *eae*, sus variantes, otros genes de virulencia, sitios de inserción de LEE y clados de virulencia de las cepas en examen

En el capítulo 2, se estudió por PCR la presencia de los genes *stx1*, *stx2* y *eae*, y sus variantes, así como la presencia de otros genes implicados en la virulencia, principalmente genes relacionados a la adherencia bacteriana a células eucariotas. Esto permitió conocer la distribución de los diferentes atributos de virulencia seleccionados y sus variantes en este conjunto de cepas.

También se analizaron los sitios de inserción de la isla de patogenicidad LEE, así como los clados a los que pertenecen las cepas O157, a los efectos de profundizar en las características genómicas y de virulencia de las cepas analizadas, respectivamente.

En comparación con las cepas de *E. coli* no patógenas con tamaños de genoma de 4,5 a 5 Mbp, las *E. coli* patógenas con frecuencia llevan ADN adicional y alcanzan sus genomas tamaños de hasta 5.9 Mbp. Este ADN adicional es a menudo localizado en plásmidos, profagos o islas genómicas, los cuales podrían adquirirse mediante transferencia horizontal de genes. Las islas genómicas son regiones de ADN distintas que suelen ser superiores a 30 kbp, y su contenido de GC difiere del genoma del hospedador. A menudo están flanqueados por secuencias de inserción o repeticiones directas. Cuando en ellas están presentes genes adicionales asociados a patogenicidad, son también conocidas como islas de patogenicidad (PAI) (Saile *et al.*, 2018).

Metodología

Detección de *stx1* y *stx2* y sus variantes por PCR

Los genes de virulencia *stx1/stx2* se determinaron por multiplex PCR según el procedimiento descrito por Pollard *et al.*, 1990, y las variantes de estos genes se analizaron por PCR según Scheutz *et al.*, 2012. Para *stx1* se analizaron las variantes *stx1a*, *stx1c* y *stx1d* mientras que para *stx2* se estudiaron las variantes *stx2a*, *stx2b*, *stx2c* y *stx2d*. Las variantes *stx2e* y *stx2f* se decidieron no estudiar ya que corresponden a variantes poco asociadas a enfermedad en humanos: la variante *stx2e* se la ha relacionado con la enfermedad edematosa en cerdos mientras que la variante *stx2f* ha sido vinculada a aves (Friedrich *et al.*, 2002).

Todas las PCR a tiempo final de esta tesis se realizaron en un termociclador GeneAmp®, PCR System 2700, Applied Biosystem.

Los productos de PCR se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 2%, con posterior tinción con Bromuro de Etidio (Green and Sambrook, 2012) utilizando un marcador de 100 pb (Biolyne).

Detección del gen *eae* y sus variantes

El gen que codifica para la intimina (*eae*) y sus variantes *eae_γ1* y *eae_β1*, se estudiaron por PCR según los procedimientos descritos por Gannon y Blanco respectivamente (Gannon *et al.*, 1993; Blanco *et al.*, 2005). Cabe señalar que solo se estudiaron dos variantes basados en resultados anteriores con STEC de estos serogrupos.

Los productos de PCR se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 2%, con posterior tinción con Bromuro de Etidio (Green and Sambrook, 2012) utilizando un marcador de 100 pb (Biolyne).

Detección de genes asociados con la virulencia

Se seleccionó previamente un conjunto de genes de virulencia adicionales de STEC, principalmente relacionados a estructuras de la superficie bacteriana que participan de la adherencia a diferentes células eucariotas y otros vinculados a la reorganización de la actina en la formación del pedestal. Cabe señalar que esta es una visión parcial y que claramente es superada por los resultados que se podrían obtener con la WGS.

PCR para *katP*. Se realizó la amplificación del fragmento de 2126 pb correspondiente al gen *katP*, según el procedimiento descrito previamente (Brunner *et al.*, 1996, Kado *et al.*, 1981).

PCR para *espP*. Se realizó la amplificación del fragmento de 1830 pb correspondiente al gen *espP*, según el procedimiento descrito previamente (Pradel *et al.*, 2008, Kado *et al.*, 1981).

PCR para *espJ*. Se realizó la amplificación del fragmento de 700 pb correspondiente al gen *espJ*, según el procedimiento descrito previamente (Marches *et al.*, 2008, Garmendia *et al.*, 2005).

PCR para *tccP*. La detección de este gen (amplicón 1000 pb), se realizó por PCR según lo descrito por Garmendia *et al.* (Garmendia *et al.*, 2005).

PCR para el gen de *lpf*. Se realizó según el procedimiento descrito por Torres *et al.* (Torres *et al.*, 2009), (tamaño de amplicón entre 400-500 pb).

PCR para el gen de *hcpA*. Se utilizó el procedimiento descrito por Xicohtencatl *et al.* (Xicohtencatl *et al.*, 2007), con un tamaño de amplicón entre 800-900 pb.

PCR para el gen de F9 FIMBRIAE. Se realizó siguiendo el procedimiento descrito por van Wurpel *et al.* (Wurpel *et al.*, 2014), con un tamaño de amplicón entre 600-700 pb.

PCR para el gen *ihA*. Se realizó siguiendo el procedimiento descrito por Schmidt (Schmidt *et al.*, 2001).

Clados de virulencia

Para el caso de los aislamientos STEC O157 se estudió a qué clado de virulencia pertenecen, tipificando SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) objetivos, utilizando PCR en tiempo real con cebadores horquilla. Se utilizó el termociclador RotorGene Q de Qiagen. Los clados 1 a 3 y 8 se identificaron utilizando los SNPs descritos por Riordan *et al.*, en 2008 (ver tablas 4 y 5). La técnica se basa en realizar PCR con dos juegos de *primers* para definir cada SNP. Para cada sitio se hacen 2 reacciones. Ambas utilizan un primer común C en un caso con un primer de referencia (R) y en la otra reacción otro cebador con una mutación en la última base del primer diagnóstico (D), que pone de manifiesto la sustitución. Si la secuencia es más específica para el primer R, por ejemplo, la reacción de amplificación es más eficiente, se obtiene más ADN y el valor de CT es menor. Se debe entonces calcular la diferencia de los CT entre el obtenido con el cebador R y con el D. Hay SNPs que son diagnósticos, por ejemplo, una A (adenina) en posición 539 diagnóstica clado 8, si no es A hay que seguir analizando para la siguiente posición que es la 1060. Las posiciones 539, 1060, 438, etc, son las posiciones del SNP en el gen de interés, contando a partir del ORF (marco abierto de lectura). Cabe señalar que hay casos en los que el primer D es el *forward* y otros en los que es el *reverse*, y se analiza de diferente manera la letra en esa posición: cuando el diagnóstico es el reverse, leo la letra del complementario al primer, mientras que si es forward leo la letra del primer.

Tabla 4. Primers horquilla y SNP objetivo.

ID* y cebador	Objetivo (clados(s))**	Secuencia (5'---3')***
ECs2357		
539C-RHP	R (1–7, 9)	CCGAGCGTTTTCCAGTGGCTCGG
539A-RH	D (8)	ACGAGCGTTTTCCAGTGGCTCGT
539-F	Common	GAATCTGCAGGCCAAAATTC
ECs2521		
1060G-FHP	R (2–9)	CGTGTAAGTGCAGCACTGCCAGAACAGTTACACG
1060T-FHP	D (1)	AGTGTAAGTGCAGCACTGCCAGAACAGTTACACT
1060-R	Common	TTCGGAGCCCCGGTTATT
ECs3881		
438C-FHP	R (3–9)	GGTGCACATTACGACTAAGACGTGTGCACC
438T-FHP	D (1, 2)	AGTGCACATTACGACTAAGACGTGTGCACT
438-R	Common	GGACAGCGACCATGCAG
ECs4130		
630C-RHP	R (4–9)	CGGCTTAATCTGTACTGCGTTGATTAAGCCG
630T-RHP	D (1, 2, 3)	TGGCTTAATCTGTACTGCGTTGATTAAGCCA
630-F	Common	GGCACCGTTGTGCTGCTTAT

* El identificador de locus (ID) se basa en el genoma publicado de *E. coli* O157: H7 Sakai (nº de acceso a GenBank BA000007). ** El objetivo del cebador HP es para la secuencia de referencia (R) o de diagnóstico (D); el (los) clado (s) para los que los cebadores HP son específicos se dan entre paréntesis. Los cebadores comunes son inespecíficos. *** Las secuencias de cebadores se basan en la secuencia de *E. coli* O157: H7 Sakai; Las regiones de HP están subrayadas y los SNP en negrita. (tomado de Riordan *et al.*, 2008).

Tabla 5. Perfiles SNP de cepas.

CLADO** O CEPAS	PERFIL SNP***			
	539 (C/A)	1060 (G/C)	438 (C/T)	630 (C/T)
1	C	C*	T*	T*
2	C	G	T*	T*
3	C	G	C	T*
4	C	G	C	C
5	C	G	C	C
6	C	G	C	C
7	C	G	C	C
8	A*	G	C	C

9	C	G	C	C
K12	C	G	C	C

**Basado en el trabajo de Manning *et al.*, 2008. El perfil SNP se asocia con el clado respectivo. El SNP se describe en términos de la posición de los nucleótidos dentro del ORF, y el polimorfismo se da en paréntesis. Los asteriscos denotan SNP de diagnóstico. (tomado de Riordan *et al.*, 2008).

Sitios de inserción de la isla de patogenicidad LEE

La ocupación del sitio de integración cromosomal del locus de borrado de enterocitos (LEE), fue analizada según el procedimiento descrito por Hauser *et al.*, 2013. Se estudiaron los sitios de inserción *selC*, *pheU* y *pheV*. Se utilizó *E. coli* K12 como control negativo, que no tiene ninguno de estos sitios ocupados.

Análisis estadístico

Los resultados de frecuencia absoluta entre los grupos O157 y no-O157 se compararon utilizando el test de chi cuadrado, y en caso de corresponder se aplicó la corrección de Yates (Sokal y Rohlf, 1998), para determinar si había diferencias estadísticamente significativas entre las proporciones encontradas de genes. También se realizaron análisis de asociación entre la presencia de algunos genes o los sitios de ocupación de la Isla LEE y los grupos O157 y no-O157, utilizando el test de chi cuadrado. En los casos en que la frecuencia en alguno de los grupos fue menor a cinco, se realizó el test exacto de Fisher. Los valores de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa Past (versión 4.03) (Hammer y Harper, 2001), y se presentan en el anexo VIII.

Resultados y Discusión

Detección de los genes *stx1*, *stx2* y sus variantes por PCR

Se determinó la distribución de los genes *stx1*, *stx2*, y sus variantes en todos los aislamientos (ver tabla 6 donde se presentan los aislamientos locales y anexo II para las cepas de referencia y control).

Tabla 6. Distribución de los genes de virulencia *stx1*, *stx2* en todos los aislamientos locales analizados y sus variantes.

Aislamiento	Origen	Serotipo/Serogrupo	<i>stx1</i>	Variantes <i>stx1</i>	<i>stx2</i>	Variantes <i>stx2</i>
1	Alimentos	O157:H7	+	A 933J	+	C
2	Alimentos	O157:H7	-	---	+	A/C/D
3	Alimentos	O157:H7	+	A 933J/C	+	C
4	Alimentos	O157:H7	-	----	+	A/C
6	Alimentos	O157:H7	+	A 933J/C	-	---
7	Alimentos	O157:H7	+	A 933J/C	+	A/C
8	Alimentos	O157:H7	+	A 933J/C	+	A/C/D
9	Alimentos	O157:H7	-	----	+	A/C/D
10	Alimentos	O157:H7	-	----	+	A/C/D
12	Alimentos	O157:H7	-	----	+	A/C/D
13	Alimentos	O157:H7	-	----	+	A/C/D
14	Alimentos	O157:H7	-	----	+	A/C/D
15	Alimentos	O157:H7	+	A 933J/C	+	D
16	Alimentos	O157:H7	+	A 933J/C	+	A/C/D
17	Alimentos	O157:H7	+	A 933J/C	+	D
18	Alimentos	O157:H7	+	A 933J/C	+	A/D
19	Alimentos	O157:H7	-	----	+	C/D
20	Alimentos	O157:H7	+	A 933J/C	+	C/D
21	Hamburguesa	O157:H7	-	----	+	A/C
22	ND	O157:H7			+	
23	Alimentos	O157:H7	-	---	+	D
24	Humano	O157:H7	+	A 933J/C	+	A/C
25	Animal	O157:H7	+	A 933J/C	+	A/C/D
27	Alimentos	O157	+	A 933J	+	A/C/D
28	Alimentos	O157:H7	+	A 933J/C	+	A/C/D
29	Alimentos	O157	-	----	+	A/D
30	Alimentos	O157:H7	+	A 933J/C	+	A/C/D
31	Alimentos	O157:H7	-	---	+	A/C/D
34	Alimentos	O157:H7	+	A 933J/C	+	C/D

36	Alimentos	O157:H7	-	---	+	C/D
39	Alimento carne picada	O157:H7	+	A 933J/C	+	nd
40	Alimento	O157:H7	-	---	+	A/C
41	Alimento carne picada	O157:H7	+	A 933J/C	+	A/C/D
42	Alimentos	O157:H7	+	A 933J/C	-	---
43	Alimentos	O157:H7	+	A 933J/C	+	A/C/D
44	Cuero Ganado	O157:H7	+	A 933J/C	+	A/C/D
45	Alimentos	O157:H7	+	A 933J/C	+	A/C/
46	Carne	O157:H7	-	----	+	A/C/D
47	Carne	O157:H7	+	nd	+	A/C/D
48	Carne	O157:H7	+	A 933J/C	-	---
49	Alimentos	O157:H7	-	----	+	A/C
50	Humano (síndrome urémico hemolítico niño)	O145	+	nd	+	A/C
51	Alimentos	O157:H7	-	----	+	A/C/D
52	Humano (síndrome urémico hemolítico)	O145	-	----	+	A/C
54	Humano (síndrome urémico hemolítico)	O26	+	A 933J	+	A/C
56	Alimentos	O103	-	---	+	A/C
60	Humano	O26:H11	+	A 933J/C	-	---
61	Humano	O153:HNT	-	---	+	A
67	Ganado	O26	+	A 933J/C	-	---
68	Ganado	O26	+	A 933J/C	+	nd
69	Humana (SUH)	O111	+	nd	+	nd

Al analizar la distribución de estos genes en este conjunto de aislamientos locales y en relación al serogrupo/serotipo (gráfico 4, tabla 7 y anexo VIII) se observa que en el caso de los aislamientos O157, el 59% de los mismos presentaron el gen *stx1*, el 95% el gen *stx2*, y el 51% combinaciones de ambos. Por lo cual el gen *stx2* sería el de mayor prevalencia en las cepas de este serogrupo analizadas.

Con respecto a los aislamientos no-O157, la distribución de los genes *stx* fue la siguiente, 67% presentaron el gen *stx1*, 67% el gen *stx2* y el 33% de los aislamientos locales combinaciones de ambos, presentándose el gen *stx2* con igual prevalencia que el gen *stx1*, y una menor combinación de ambos genes si se compara este resultado con el obtenido en los aislamientos O157.

No se observaron asociaciones entre los genes *stx1*, *stx2* o ambos en relación a los grupos O157 vs. no-O157 con significancia estadística (ver anexo VIII).

Si extrapolamos estos resultados al total de aislamientos locales estudiados, el 60% presentó al gen *stx1*, el 90% el gen *stx2* y el 48% combinaciones de ambos genes. Podemos afirmar entonces que, el gen *stx2* es el que se presenta con mayor prevalencia en este conjunto de cepas. Si comparamos estos resultados con el análisis realizado en los aislamientos de origen humano, observamos que en los mismos los porcentajes de prevalencia aumentan para el gen *stx1* (71%), así como para la combinación de ambos genes en el mismo genoma (57%), mientras que el gen *stx2* (86%) presenta una prevalencia similar. Por lo cual las cepas STEC responsables de procesos infecciosos en seres humanos incluídas en este trabajo, son portadoras de un mayor número de estos genes que las cepas recuperadas de alimentos. En este sentido se deberían estudiar los fagos presentes en el cromosoma de cada bacteria ya que algunos autores afirman que la presencia de más de un fago Stx idéntico coexistiendo en el cromosoma de la misma bacteria, contrariamente a lo que indica la teoría de inmunidad fágica descrita para el fago λ , genera una interferencia, que produce una disminución en la inducción de ambos fagos, disminuye por tanto la producción de la toxina y como consecuencia la cepa resultaría menos virulenta. En el trabajo desarrollado por SerraMoreno, utilizaron una *E. coli* K12 para colocar las construcciones, la toxina Shiga se cuantificó mediante inmunoensayos y mediante ensayo de citotoxicidad en células Vero. Los resultados indican que la presencia de más de un profago en el cromosoma del huésped podría considerarse como un mecanismo para permitir la retención genética en la célula, al reducir la activación del ciclo lítico y, por tanto, la patogenicidad de las cepas (SerraMoreno *et al.* 2008).

Los mismos autores señalan que los fagos no solo servirían entonces como reservorios para los genes *stx*, sino que participarían en la regulación de la producción de la toxina, siendo la movilidad de genes mediada por fagos un mecanismo de evolución bacteriana altamente complejo (SerraMoreno *et al.* 2008). Sin embargo, los resultados en las cepas STEC recuperadas de seres humanos en el conjunto de cepas locales estudiadas sugieren lo contrario a lo arriba expresado y serían concordantes con trabajos que reportan que las cepas de STEC con dos copias de un gen *stx* produjeron significativamente más Stx in vitro que las cepas del mismo serotipo que contenían una sola copia del mismo gen *stx* (Bielaszewska *et al.* 2006b). Por el contrario, se ha identificado alguna evidencia de competencia con Stx en *E. coli* O157:H7 patógena de tipo salvaje. Se debe profundizar en los estudios de O157 vs. no-O157 que mostrarían una tendencia mayor para adquirir material genético incluyendo genes de resistencia (Sasaki *et al.*, 2012).

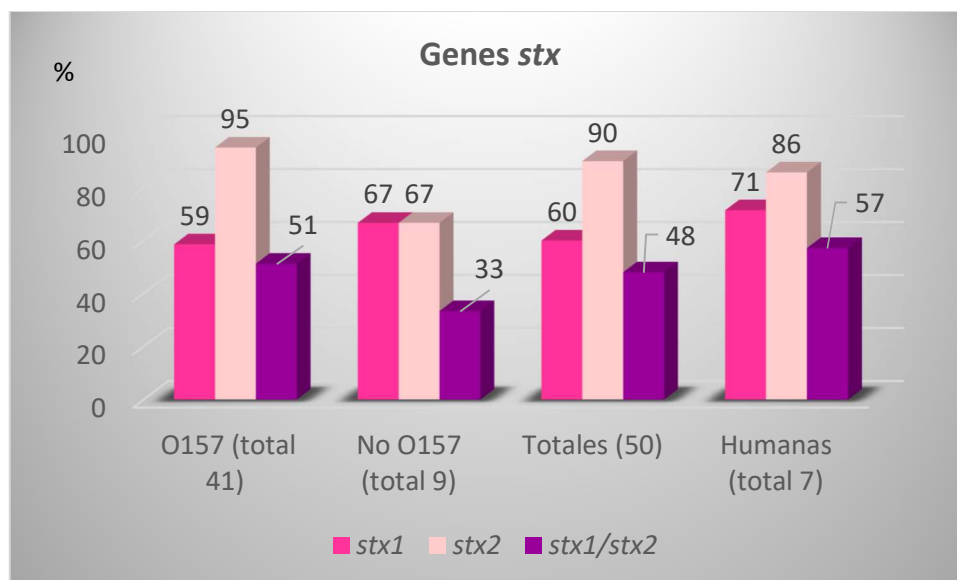


Gráfico 4. Distribución de los genes de virulencia *stx1* y *stx2*, discriminados por serogrupo y aislamientos de origen humano informados como porcentaje dentro de cada grupo en los aislamientos locales.

Tabla 7. Distribución en los aislamientos locales de los genes de virulencia *stx1*, *stx2* y sus variantes asociadas a cepas O157 y no-O157, así como a aislamientos de origen humano. (nd: no determinado).

Variantes de <i>stx1</i>											
Aislamientos	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>stx1/stx2</i>	<i>stx1a</i>	<i>stx1c</i>	<i>stx1d</i>	<i>stx1a,c</i>	<i>solo stx1a</i>	<i>Nd</i>		
O157 (total 41)	24 (59%)	39 (95%)	21 (51%)	23 (56%)	21 (51%)	0 (0%)	21 (51%)	2 (5%)	0 (0%)		
no-O157 (total 9)	6 (67%)	6 (67%)	3 (33%)	4 (44%)	3 (33%)	0 (0%)	3 (33%)	1 (11%)	2 (22%)		
Totales (50)	30 (60%)	45 (90%)	24 (48%)	27 (54%)	24 (48%)	0 (0%)	24 (48%)	3 (6%)	2 (4%)		
Humanas (total 7)	5 (71%)	6 (86%)	4 (57%)	2 (29%)	2 (29%)	0 (0%)	2 (29%)	1 (14%)	2 (29%)		
Variantes de <i>stx2</i>											
Aislamientos	<i>stx2a</i>	<i>stx2b</i>	<i>stx2c</i>	<i>stx2d</i>	<i>stx2a/stx2c</i>	<i>stx2a/stx2d</i>	<i>stx2c/stx2d</i>	<i>stx2a/stx2c/stx2d</i>	<i>solo stx2a</i>	<i>solo stx2c</i>	<i>solo stx2d</i>
O157 (total 41)	28 (68%)	0 (0%)	32 (78%)	28 (68%)	7 (17%)	2 (5%)	4 (10%)	19 (46%)	0 (0%)	2 (5%)	3 (7%)
no-O157 (total 9)	5 (56%)	0 (0%)	4 (44%)	0 (0%)	4 (44%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (11%)	0 (0%)	0 (0%)
Totales (50)	33 (66%)	0 (0%)	36 (72%)	28 (56%)	11 (22%)	2 (4%)	4 (8%)	19 (38%)	1 (2%)	2 (4%)	3 (6%)
Humanas (total 7)	5 (71%)	0 (0%)	4 (57%)	0 (0%)	4 (57%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (14%)	0 (0%)	0 (0%)

En la tabla 7 (para los aislamientos locales y anexo II para las cepas de referencia y control), también se presenta un resumen de las variantes de los genes *stx1* y *stx2*, discriminadas por serogrupo, así como un detalle de los aislamientos de origen humano. Los mismos resultados se muestran en el gráfico 5. Cabe destacar con respecto a esta técnica que al utilizar la temperatura de *annealing* reportada en el trabajo original se obtuvieron resultados que no fueron concordantes con las posteriores secuenciaciones genómicas, encontrándose varios falsos positivos para los genes *stx1c* y *stx1d*; este problema está reportado en el trabajo original. Por este motivo se debieron repetir los ensayos, modificando en varios grados las temperaturas de *annealing*, llegándose a utilizar valores de 68°C con el objetivo de adaptar la tecnología a las condiciones y equipos que disponemos en nuestro laboratorio. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos para la variante *stx2d*, los mismos deberían confirmarse por

WGS, aunque hay trabajos similares que no usan WGS e informan los resultados de la tipificación por PCR.

Se han podido conocer las distribuciones de las variantes de los genes *stx1* y *stx2* productores de toxina Shiga. En el caso de *stx1* la variante a se presentó con mayor frecuencia tanto al analizar los aislamientos O157, los no-O157, así como el total de cepas, mientras que para los aislamientos humanos las variantes a y c presentaron la misma frecuencia. Cabe destacar que en dos de los aislamientos no se ha podido determinar la variante correspondiente a este gen, pudiendo ser la cuarta variante reportada para el gen *stx1*, la *stx1e* hasta el momento relacionada a *Enterobacter cloacae* (FAO, 2018).

Con respecto al gen *stx2*, *stx2c* es la variante con mayor prevalencia si el análisis se realiza con respecto a los aislamientos O157 y a los totales, en cambio si se analizan las cepas no-O157, así como los aislamientos de origen humano, la variante *stx2a* es la que presenta mayor prevalencia. La combinación de las variantes a (asociada a procesos severos), c y d (este resultado debería ser confirmado), resultó ser la más frecuente tanto en los aislamientos O157 como en el total, mientras que la combinación a y c fue la más frecuente en las cepas no-O157 y en las humanas. Con respecto a las cepas O157 del clado 8, las variantes encontradas fueron *stx2a*, *stx2c* y *stx2d* (que no se confirmó por WGS) para la cepa N°2, *stx2a*, *stxc* para la cepa N°4 y *stx2a* y *stx2d* para la cepa N°29. El haber encontrado la variante a en una elevada prevalencia (71%) de los aislamientos obtenidos a partir de casos clínicos, es concordante con lo reportado por otros autores previamente (Friedrich *et al.*, 2002; Beutín *et al.*, 2012; Joseph *et al.*, 2020), al igual que la combinación a y c en aislamientos provenientes de casos clínicos (Oderiz, *et al.*, 2018). La variante *stx2a* mostró las tasas más altas de

asociación con SUH, hospitalización y se asocia a casos severos según el último informe de la EFSA (EFSA, 2020).

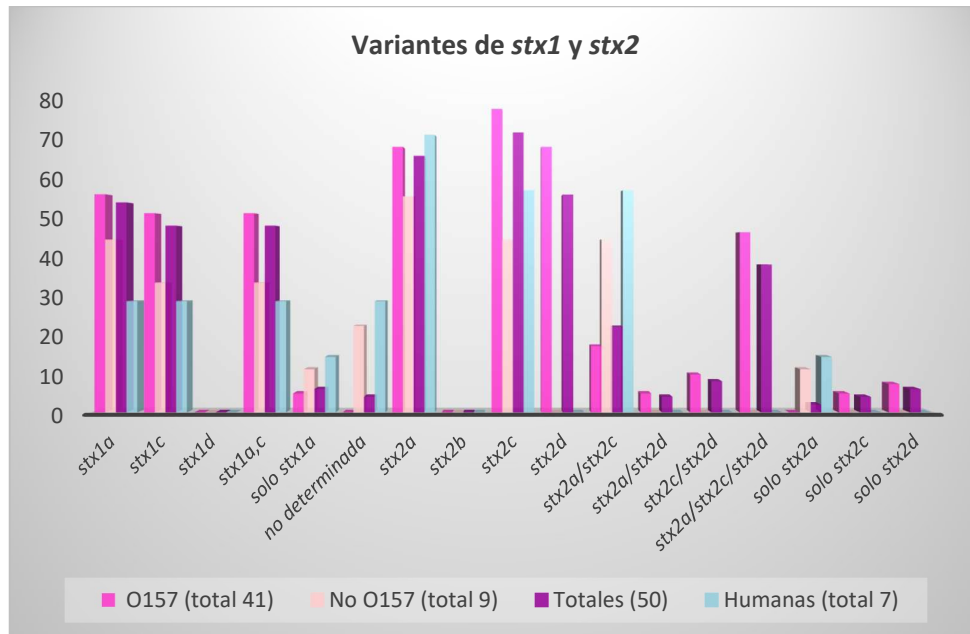


Gráfico 5. Distribución en los aislamientos locales estudiados de las variantes de los genes de virulencia *stx1* y *stx2*, discriminados por serogrupo y aislamientos de origen humano informados como porcentaje dentro de cada grupo.

Detección del gen *eae* y sus variantes

Se determinó la distribución del gen *eae* que codifica para la proteína de membrana externa intimina, responsable de la adherencia estrecha de STEC con los enterocitos, y de las variantes estudiadas $\gamma 1$ y $\beta 1$, en los aislamientos objeto de estudio (ver tabla 8, gráfico 6, anexo VIII para las cepas locales y anexo II para las cepas de referencia y controles). El gen *eae* se detectó en el 94% de las cepas estudiadas, estando presente en 38 aislamientos O157 (93%) y en 9 aislamientos no-O157 (100%). Al realizar el análisis en los aislamientos de origen clínico se observó que el 100% de los mismos presentaron este gen, de acuerdo con la sugerencia de

que su presencia se asocia con su capacidad patogénica, aunque, como vimos antes, su ausencia no la descarta.

La variante $\Upsilon 1$ resulto ser la única identificada en las cepas O157 con una prevalencia del 66%, no habiéndose encontrado en este serogrupo la variante $\beta 1$ (lo cual es un resultado esperable), hubo 11 aislamientos de este grupo que no correspondieron ni a $\Upsilon 1$ ni a $\beta 1$, por lo cual no se asignó a que variante corresponden. Para las cepas no-O157 solo se identificó la variante $\beta 1$, con una prevalencia del 67%. Cabe señalar que en los aislamientos no-O157 no se identificó la variante en 3 casos (O103, O153:HNT (caso clínico) y O26 (ganado). En los aislamientos de origen humano se encontraron ambas variantes, siendo la $\beta 1$ la más frecuente (71%), este hecho está relacionado a los serotipos correspondientes a las cepas de este grupo. Por lo tanto, debido a que no se contaba con todos los cebadores y no se secuenciaron todas las cepas para ver otras variantes asociadas a los serogrupos estudiados aquí, en un total de 14 cepas no se pudo determinar a qué variante correspondían. Se observaron asociaciones entre los genes $\Upsilon 1$ y $\beta 1$ en relación a los grupos O157 vs. no-O157 con significancia estadística (ver anexo VIII).

Ensayos posteriores podrían evaluar otras variantes en este conjunto de cepas ya que solo se buscaron las variantes previamente mencionadas y se ha reportado previamente que algunas cepas O157 portan la variante alfa1/2 y cepas O26 la variante $\beta 1/2$. Por su parte las cepas O45 y O103 pueden tener la variante épsilon (ϵ), esta variante posee 948 aminoácidos (aa) y comparte la mayor identidad de secuencia global con intimina β , aunque el análisis de los últimos 280 aa C-terminales sugiere una mayor similitud con las intiminas α y γ (Oswald *et al.*, 2000).

Tabla 8. Distribución en los aislamientos locales del gen de virulencia *eae* y sus variantes asociadas al serotipo O157 y no-O157, así como a aislamientos de origen humano. Se informan los porcentajes correspondientes en relación al total de aislamientos por grupo.

Aislamientos locales	<i>eae</i>	variante <i>eae</i> γ 1	variante <i>eae</i> β 1	ND
O157 (total 41)	38 (93%)	27 (66%)	0 (0%)	11 (27%)
no-O157 (total 9)	9 (100%)	0 (0%)	6 (67%)	3 (33%)
Totales (50)	47 (94%)	27 (54%)	6 (12%)	14 (28%)
Humanas (total 7)	7 (100%)	1 (14%)	5 (71%)	1 (14%)

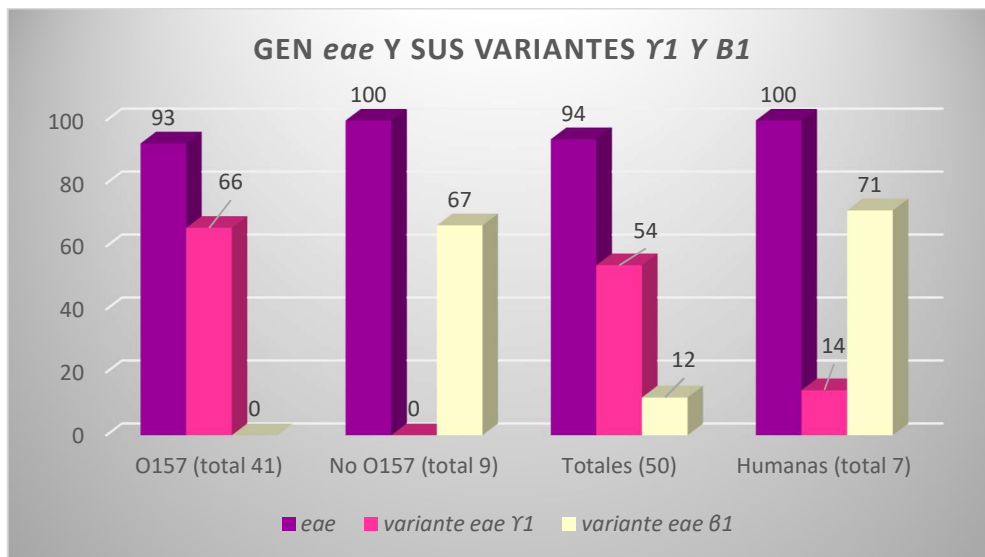


Gráfico 6. Distribución en los aislamientos locales del gen de virulencia *eae* y sus variantes *eae* γ 1 y *eae* β 1, discriminados por serogrupo y aislamientos de origen humano informados como porcentaje dentro de cada grupo.

Ensayos futuros deberían evaluar si las cepas O157 que dieron negativo a gamma 1 podrían presentar una nueva variante, análogo a lo reportado previamente en cepas EPEC aisladas de niños en nuestro país, donde se identificaron dos nuevas variantes (μ B and ξ R/ β 2B) (Blanco *et al.*, 2006). La región N-terminal de la molécula de Intimin es conservada, y la secuencia C-

terminal variable, define al menos 27 subtipos de Intimin diferentes. EHEC O157: H7 se caracteriza por el subtipo Intimin γ 1 (Menezes *et al.*, 2011).

Detección de genes asociados con la virulencia

En relación a la presencia de otros genes implicados en la virulencia, principalmente genes relacionados a la adherencia bacteriana a células eucariotas se analizó la presencia de los genes *tccP*, *espJ*, F9, *iha*, *lpf*, *hcpA*, *katP* y *espP*. Se evidenció una rica distribución de estos factores de virulencia adicionales (ver tabla 9 para cepas locales y anexo II para cepas de referencia y controles). El gen *lpf* se detectó en el 88% de los aislamientos, mientras que *iha* se presentó en el 86% de los aislamientos (ver tabla 10). En lo que respecta a *hcpA* se presentó en el 68% de los casos mientras que F9 es un gen que se detectó en el 92% de los aislamientos STEC; *tccp* y *espJ* son genes que presentaron ambos alta prevalencia en los aislamientos O157 (95%). *KatP* se presentó con una prevalencia del 50% en el total de aislamientos, y *espP* 78%. En todos los casos se presentaron con una mayor frecuencia en las cepas O157 que en las no-O157 con significancia estadística (ver anexo VIII).

Las cepas O157: H7 contiene dos loci *lpf* no idénticos, homólogos a las fimbrias polares largas (LPF) de *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. La expresión del operón *lpf* 1 de *E. coli* O157:H7 (*lpf1*) en *E. coli* K-12 se ha asociado con una mayor adherencia a las células cultivadas en tejidos y con la aparición de fimbrias largas (Farfan *et al.*, 2011).

La adhesina homóloga de IrgA (*Iha*), codificada por *iha*, es una proteína que confiere adherencia y también un receptor de sideróforo distribuido entre las cepas de STEC negativas a LEE, STEC LEE positivas, así como *E. coli* uropatógeno. Se ha reportado la presencia de diferentes subtipos de *iha* en cepas de STEC LEE-negativas. Se describió por primera vez como una adhesina en una cepa STEC O157: H7, y se denominó “adhesina homóloga IrgA” debido

a la homología compartida con la IrgA de *Vibrio cholerae*. El gen *iha* se ha encontrado en islas genómicas duplicadas (llamadas OI-43 y OI-48), en elementos genéticos móviles que codifican otros factores de virulencia implicados en la patogenicidad humana, plásmidos e islas de patogenicidad (PAI). Por ejemplo, el plásmido pO113 codifica varias toxinas y adhesinas como EhxA, Saa, SubAB e Iha; el locus de actividad de proteólisis de PAI (LPA) codifica EspI e Iha. Iha también ha sido encontrado en un nuevo PAI, el *Locus of Adhesion and Autoaggregation* (LAA), una isla de patogenicidad presente en cepas emergentes de *Escherichia coli* productoras de toxina Shiga (Colello *et al.*, 2019).

En las STEC de O157, el *cluster ehx* se encuentra en un plásmido llamado pO157. Tres supuestos genes de virulencia derivados de pO157 son *toxB*, *katP* y *espP* (Fu *et al.*, 2019).

F9 determina las fimbrias responsables del tropismo que exhibe *E. coli* O157: H7 para el recto terminal del ganado. Las fimbrias se denominaron fimbrias de *E. coli* "F9", identificadas en la O-isla 61 (Low *et al.* 2006).

Tccp es propia de STEC, es una proteína de acoplamiento Tir-citoesqueleto (también conocida como EspF (U), que participa en el ensamblaje de actina en la formación del pedestal, como molécula adaptadora, desencadenando la polimerización de actina localizada junto a EspF. *TccP* se transporta en el profago CP-933U, formando un operón con el gen *espJ* corriente arriba (Garmendia *et al.*, 2005; Matussek *et al.*, 2017).

Por otra parte, la catalasa-peroxidasa (*katP*), se encuentra codificada en el plásmido pO157 de STEC junto a otros factores de virulencia, aportando genes para adhesina ToxB57, metaloproteasa dependiente de zinc (*StcE*) y para la enterohemolisina (*Ehx*) (Farfán *et al.*, 2016).

Tabla 9. Distribución de los genes de factores responsables de virulencia adicionales a los típicos de STEC en aislamientos locales.

Aislamiento	Genes de virulencia adicionales									
	Origen	Serotipo	<i>lpf</i>	<i>hcpA</i>	<i>lha</i>	F9	<i>tccP</i>	<i>espJ</i>	<i>katP</i>	<i>espP</i>
1	Alimentos	O157:H7	+	+	+	+	+	+	+	+
2	Alimentos	O157:H7	+	+	+	+	+	+	-	+
3	Alimentos	O157:H7	+	+	+	+	+	-	+	+
4	Alimentos	O157:H7	+	+	+	+	+	+	-	+
6	Alimentos	O157:H7	+	+	+	+	+	+	+	+
7	Alimentos	O157:H7	+	-	+	+	+	+	-	+
8	Alimentos	O157:H7	+	+	+	+	+	+	-	+
9	Alimentos	O157:H7	+	-	+	+	+	+	+	+
10	Alimentos	O157:H7	+	+	+	+	+	+	+	+
12	Alimentos	O157:H7	+	-	+	+	+	+	+	+
13	Alimentos	O157:H7	+	+	+	+	+	+	+	+
14	Alimentos	O157:H7	+	+	+	+	+	+	-	+
15	Alimentos	O157:H7	+	+	+	+	+	+	-	+
16	Alimentos	O157:H7	+	+	+	+	+	+	+	+
17	Alimentos	O157:H7	+	+	-	+	+	+	+	+
18	Alimentos	O157:H7	+	+	+	+	+	+	+	+
19	Alimentos	O157:H7	+	+	+	+	+	+	+	+
20	Alimentos	O157:H7	+	-	+	+	+	+	+	+
21	Hamburguesa	O157:H7	+	-	+	+	+	+	+	+
22	ND	O157:H7	-	-	-	-	-	-	-	-
23	Alimentos	O157:H7	+	-	+	+	+	+	-	+
24	Humano	O157:H7	+	-	+	+	+	+	-	-
25	Animal	O157:H7	+	-	+	+	+	+	-	+
27	Alimentos	O157	+	+	+	+	+	+	+	+
28	Alimentos	O157:H7	+	+	+	+	+	-	+	+
29	Alimentos	O157	+	+	+	+	+	+	-	+
30	Alimentos	O157:H7	+	+	+	+	+	+	+	+
31	Alimentos	O157:H7	+	+	+	+	+	+	-	+
34	Alimentos	O157:H7	-	+	+	+	+	+	+	+
36	Alimentos	O157:H7	+	-	+	+	+	-	-	-
39	Alimento carne picada	O157:H7	+	+	+	+	+	+	-	+
40	Alimento	O157:H7	+	-	+	+	+	+	-	+
41	Alimento carne picada	O157:H7	+	+	+	+	+	+	-	+
42	Alimentos	O157:H7	+	-	-	+	+	+	-	+
43	Alimentos	O157:H7	+	+	+	+	+	+	+	+
44	Cuero Ganado	O157:H7	+	+	+	+	+	+	+	-
45	Alimentos	O157:H7	+	+	+	+	+	+	+	-
46	Carne	O157:H7	+	+	+	+	+	+	+	+
47	Carne	O157:H7	+	+	+	+	+	+	+	+
48	Carne	O157:H7	+	+	+	+	+	+	-	-

49	Alimentos	O157:H7	+	+	+	+	-	+	-	-
50	Humano (síndrome urémico hemolítico niño)	O145	+	+	-	-	-	-	-	-
51	Alimentos	O157:H7	+	+	+	+	+	+	-	-
52	Humano (síndrome urémico hemolítico)	O145	+	+	-	-	-	+	-	+
54	Humano (síndrome urémico hemolítico)	O26	+	+	+	+	-	-	-	-
56	Alimentos	O103	+	-	-	+	+	+	-	-
60	Humano	O26:H11	-	-	+	+	-	-	+	+
61	Humano	O153:HNT	-	-	-	-	-	+	-	+
67	Ganado	O26	-	+	+	+	-	-	+	+
68	Ganado	O26	-	-	-	+	-	-	+	+
69	Humana (SUH)	O111	-	-	+	-	-	-	-	-

Con respecto a los aislamientos de origen humano, también mostraron una rica distribución de estos factores: *lpf* e *ihA* se detectaron en el 57% de los aislados, mientras que se determinó la presencia de *hcpA*, F9 y *espJ*, en el 43% de los casos (ver tabla 10 y gráfico 7). Los genes *tccp*, *espP* y *katP* solo se determinaron en un aislamiento humano (14% de prevalencia), en el caso de *tccp* correspondió al serotipo O157:H7, *espP* al serogrupo O145 y *katP* a O26. Estos son resultados esperables ya que en otros trabajos se han comunicado hallazgos similares donde el gen *tccp* fue detectado solo en cepas STEC O157:H7, mientras que las cepas O145 fueron positivas para *espP* (Monaghan *et al.*, 2011).

En un trabajo de Garmendia y colaboradores, se analizaron un total de 172 aislamientos de STEC no-O157, de orígenes y fuentes similares, y se encontró que carecían del gen *tccP*. Estas cepas pertenecían a los siguientes serogrupos (el número de cepas se indica entre paréntesis): O1 (1), O5 (10), O9 (1), O15 (12), O16 (5), O25 (1), O26 (22), O111 (46), O112 (1), O113 (20), O116 (1), O118 (2), O121 (2), O123 (1), O128 (12), O130 (2), O145 (5), O147 (1), O153 (2), O163 (6), O168 (1), NT (13) y R (5) (Garmendia *et al.*, 2005), sin embargo en las cepas locales

analizadas se encontró un aislamiento no-O157 positivo para *tccp*, correspondiente al serotipo O103. Para el caso de STEC O157:H7, los aislados eran *tccP* +. Por el contrario, la presencia de *tccP* en cepas de STEC pertenecientes a serogrupos distintos de O157 fue inesperada, particularmente porque las cepas para las que están disponibles secuencias de Tir (por ejemplo, O26 y O111) poseen un residuo de tirosina homólogo al de la cepa de EPEC O127: H6 Y474 (Garmendia *et al.*, 2005).

No llama la atención que la presencia de estos genes *katP* y *espP* sea francamente menor en los cultivos no-O157 que justamente son los asociados a enfermedad severa en seres humanos. Este resultado es esperable ya que la posesión de los 3 genes codificados por plásmidos (*katP*, *ehxA* y *espP*) suele ser indicativa de un plásmido completo (pO157 o sus homólogos) presente mayoritariamente en STEC O157. También puede deberse a que estos factores de virulencia son más frecuentes en cepas STEC eae negativas, para aumentar su capacidad para producir daño (Kaper *et al.*, 2004). En el caso de las cepas no-O157 analizadas aquí todas portaban el gen *eae* y fueron aisladas de individuos enfermos, por lo tanto, es lógico pensar desde el punto de vista del “estado de forma” (*fitness*) de STEC que sin estos genes “accesorios” sería suficiente para sobrevivir y producir daño en los seres humanos.

Tabla 10. Distribución de los genes que codifican factores de virulencia adicionales a los típicos de STEC asociadas al serotipo O157 y no-O157. Se informan los porcentajes correspondientes en relación al total de aislamientos locales por grupo.

Genes de factores de virulencia adicionales								
	<i>lpf</i>	<i>hcpA</i>	<i>iha</i>	F9	<i>tccP</i>	<i>espJ</i>	<i>katP</i>	<i>espP</i>
Aislamientos								
O157 (total 41)	40 (98%)	30 (73%)	39 (95%)	41 (100%)	39 (95%)	39 (95%)	22 (54%)	34 (83%)
no-O157 (total 9)	4 (44%)	4 (44%)	4 (44%)	5 (56%)	1 (11%)	3 (33%)	3 (33%)	5 (56%)
Totales (50)	44 (88%)	34 (68%)	43 (86%)	46 (92%)	40 (80%)	42 (84%)	25 (50%)	39 (78%)
Humanas (total 7)	4 (57%)	3 (43%)	4 (57%)	3 (43%)	1 (14%)	3 (43%)	1 (14%)	1 (14%)

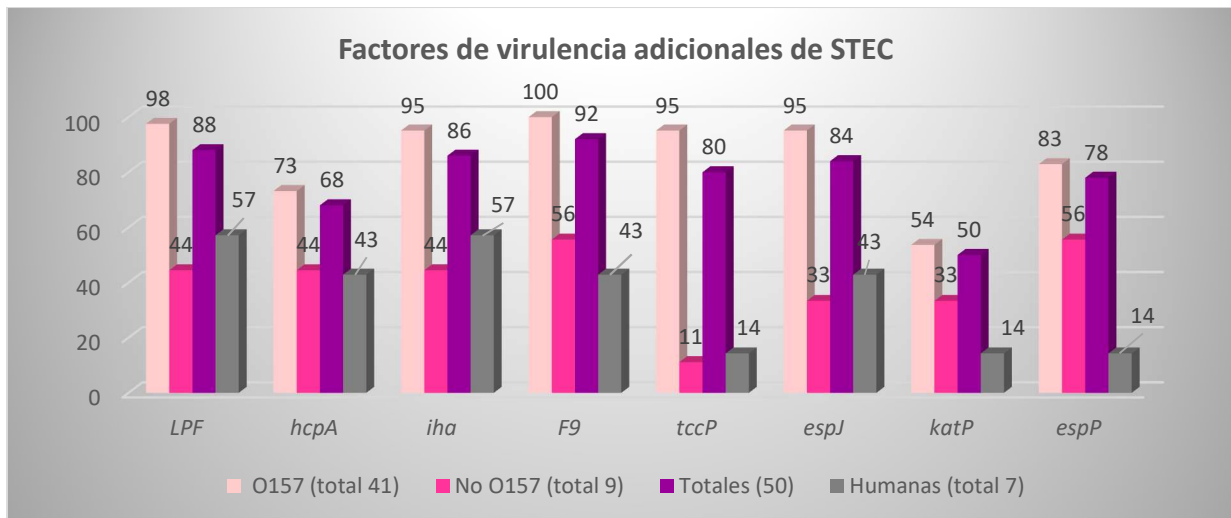


Gráfico 7. Distribución (%) en aislamientos locales, de los genes de factores de virulencia adicionales de STEC, discriminados por serogrupo y aislamientos de origen humano informados como porcentaje dentro de cada grupo.

Clados de virulencia

Se estudiaron los clados a los que pertenecen las cepas O157:H7, según el esquema acotado de Riordan, habiéndose encontrado que solo tres cepas pertenecen al clado 8, y una sola al clado 2 (cepa control), siendo estos los clados que junto al clado 3, se presentan con mayor asociación en casos de enfermedad severa o clados hipervirulentos en humanos (ver tabla 11 para las cepas locales y controles) (CDC, 1993; CDC, 2006; FDA, 2007; Manning *et al.*, 2008). En las restantes no se ha podido determinar el clado, pero de acuerdo al perfil de SNP (*single nucleotide polymorfism*) obtenido se puede afirmar que no pertenecen al clado 3, por lo cual podrían ser clado 4, 5, 6, 7 o 9. Cabe destacar que dos de las cepas que correspondieron al clado 8 se ubicaron en el mismo pulsogrupo en la PFGE y fueron del ST 11, por lo cual presentarían perfiles genéticos similares (97% de identidad). La baja incidencia de estos clados hipervirulentos en nuestro país podría entonces ser uno de los factores que explique en parte las diferencias respecto a los serogrupos/serotipos prevalentes en los casos de SUH

entre Uruguay y Argentina, donde el SUH es endémico, predominan los cultivos O157:H7 y se presenta el clado 8 con alta prevalencia (Mellor *et al.*, 2012).

Tabla 11. Perfiles de SNP en las posiciones 539, 1060, 438 y 630, de todas los aislamientos locales y las cepas control.

Nº cepa	perfil SNP				Clado definido
	539 (C/A)	1060 (G/T)	438 (C/T)	630 (C/T)	
1	C	G	C	C	
2	A	G	C	C	8
3	C	G	C	C	
4	A	G	C	C	8
6	C	G	C	C	
7	C	G	C	C	
8	C	G	C	C	
9	C	G	C	C	
10	C	G	C	C	
12	C	G	C	C	
13	C	G	C	C	
14	C	G	C	C	
15	C	G	C	C	
16	C	G	C	C	
17	C	G	C	C	
18	C	G	C	C	
19	C	G	C	C	
20	C	G	C	C	
21	C	G	C	C	
22	C	IND	IND	C	
23	C	G	C	C	
24	C	G	C	C	
25	C	G	C	C	
27	C	G	C	C	
28	C	G	C	C	
29	A	G	C	C	8
30	C	G	C	C	
31	C	G	C	C	
34	C	G	C	C	
35	C	G	T	T	2
36	C	G	C	C	
39	C	G	C	C	
40	C	G	C	C	
41	C	G	C	C	

42	C	G	C	C	
43	C	G	C	C	
44	C	G	C	C	
45	C	G	C	C	
46	C	G	C	C	
47	C	G	C	C	
48	C	G	C	C	

Sitios de inserción de la isla de patogenicidad LEE

Se estudiaron los sitios de inserción *pheU*, *selC* y *pheV*, a los efectos de inferir los sitios de inserción de la Isla de Patogenicidad LEE y otras islas con genes como Fosfoetanolamina transferasa putativa, Metiltransferasas Z1226a, Sistema toxina-antitoxina tipo IV, Familia de proteínas Inovirus Gp2. Los sitios no ocupados le permitirían incorporar más material genético. Recordar que hay cepas O157 *eae* negativas, donde resultaría interesante a futuro estudiar los sitios ocupados, cuales están ocupados y con cuales elementos (ver tabla 12 para las cepas locales y anexo II para las cepas de referencia y controles). Cabe señalar que en los casos que la PCR dio positiva a los productos de amplificación esperados (ver anexo I), esto significa que el sitio se encuentra libre, y en los casos que la reacción de PCR dió negativa, el sitio analizado estaría ocupado. Muchos de los aislamientos presentaron más de un sitio ocupado, en estos casos se podría saber cuáles son los sitios ocupados, pero no se podría afirmar en cuál de estos sitios se encuentra la isla que codifica para *eae*.

Tabla 12. Presencia/Ausencia de los productos de PCR para los sitios de inserción de la Isla de Patogenicidad LEE, *pheU*, *selC* y *pheV*, en los aislamientos locales.

Presencia/Ausencia de los productos de PCR					
Aislamientos	Origen	Serotipo	sitio <i>pheU</i>	Sitio <i>selC</i>	sitio <i>pheV</i>
1	Alimentos	O157:H7	+	-	+
2	Alimentos	O157:H7	+	-	-
3	Alimentos	O157:H7	+	-	+
4	Alimentos	O157:H7	+	-	-

6	Alimentos	O157:H7	+	-	-
7	Alimentos	O157:H7	+	-	-
8	Alimentos	O157:H7	+	-	-
9	Alimentos	O157:H7	+	-	-
10	Alimentos	O157:H7	+	-	-
12	Alimentos	O157:H7	+	-	-
13	Alimentos	O157:H7	+	-	-
14	Alimentos	O157:H7	+	-	-
15	Alimentos	O157:H7	+	-	-
16	Alimentos	O157:H7	+	-	-
17	Alimentos	O157:H7	+	-	-
18	Alimentos	O157:H7	+	-	-
19	Alimentos	O157:H7	+	-	-
20	Alimentos	O157:H7	+	-	-
21	Hamburguesa	O157:H7	+	-	-
22	ND	O157:H7	-	-	-
23	Alimentos	O157:H7	+	-	-
24	Humano	O157:H7	+	-	+
25	Animal	O157:H7	+	-	+
27	Alimentos	O157	+	-	+
28	Alimentos	O157:H7	+	-	+
29	Alimentos	O157	+	-	-
30	Alimentos	O157:H7	+	-	-
31	Alimentos	O157:H7	+	-	-
34	Alimentos	O157:H7	+	-	+
36	Alimentos	O157:H7	-	-	-
39	Alimento carne picada	O157:H7	+	-	+
40	Alimento	O157:H7	+	-	-
41	Alimento carne picada	O157:H7	+	-	+
42	Alimentos	O157:H7	+	-	-
43	Alimentos	O157:H7	-	-	-
44	Cuero Ganado	O157:H7	+	-	-
45	Alimentos	O157:H7	+	-	-
46	Carne	O157:H7	+	-	-
47	Carne	O157:H7	+	-	-
48	Carne	O157:H7	+	-	-
49	Alimentos	O157:H7	+	-	-
50	Humano (síndrome urémico hemolítico niño)	O145	-	-	+
51	Alimentos	O157:H7	+	-	-
52	Humano (síndrome urémico hemolítico)	O145	-	-	-
54	Humano (síndrome urémico hemolítico)	O26	+	+	-
56	Alimentos	O103	-	+	-
60	Humano	O26:H11	-	-	-
61	Humano	O153:HNT	-	-	-
67	Ganado	O26	-	+	-
68	Ganado	O26	-	+	-

69	Humana (SUH)	O111	-	+	-
----	--------------	------	---	---	---

En la tabla 13 y gráfico 8 se presenta la ocupación de los tres posibles sitios descritos de integración de la isla LEE, *pheU*, *selC* y *pheV*, asociados a los serogrupos O157 y no-O157 en aislamientos locales, así como a aislamientos de origen humano. Puede observarse que en el total de aislamientos analizados los sitios *selC* y *pheV* presentan una mayor ocupación, 90% y 80% respectivamente. Para los aislamientos O157 la mayor ocupación se dio en *selC* (100%), seguida de *pheV* (78%) y una muy baja ocupación para el sitio *pheU* (5%). Mientras que para los aislamientos no-O157 los sitios *pheU* y *pheV* fueron los mayormente ocupados, 89%, de todas formas, *selC* presentó una ocupación del 44%. Con respecto a los aislamientos de origen humano los sitios con mayor ocupación fueron *pheU* y *pheV* (71%). Por lo cual los diferentes serogrupos presentarían diferentes frecuencias de ocupación. Se observaron asociaciones entre los sitios ocupados en relación a los grupos O157 vs. no-O157 con significancia estadística (ver anexo VIII). Estos sitios tienen un importante papel en la adquisición de material genético que codifica para otros atributos de virulencia, sistema toxina/antitoxina, proteínas del metabolismo, etc. Cabe destacar que dentro de STEC los cultivos definidos como EHEC tendrían mayor cantidad de ARNt que otros patotipos; y no-O157 más que O157. Estos sitios permitirían la construcción temporal de los virotipos. Será interesante conocer si el ADN extraño en los diferentes sitios de integración apoya la virulencia o patogenicidad de las respectivas cepas o si la ocupación de los sitios de integración dificulta la recepción de otras islas de patogenicidad de alto impacto como el LEE y es, por lo tanto, una causa de disminución de la patogenicidad, aspectos que podrían ser abordados en futuros estudios.

Tabla 13. Ocupación de sitios descriptos de integración de la isla LEE, *pheU*, *selC* y *pheV*, asociados a los serogrupos O157 y no-O157, así como a aislamientos de origen humano. Se informan los porcentajes correspondientes en relación al total de aislamientos locales por grupo.

Ocupación de los sitios			
Aislamientos	<i>pheU</i>	<i>selC</i>	<i>pheV</i>
O157 (total 41)	2 (5%)	41 (100%)	32 (78%)
no-O157 (total 9)	8 (89%)	4 (44%)	8 (89%)
Totales (50)	10 (20%)	45 (90%)	44 (80%)
Humanas (total 7)	5 (71%)	4 (57%)	5 (71%)

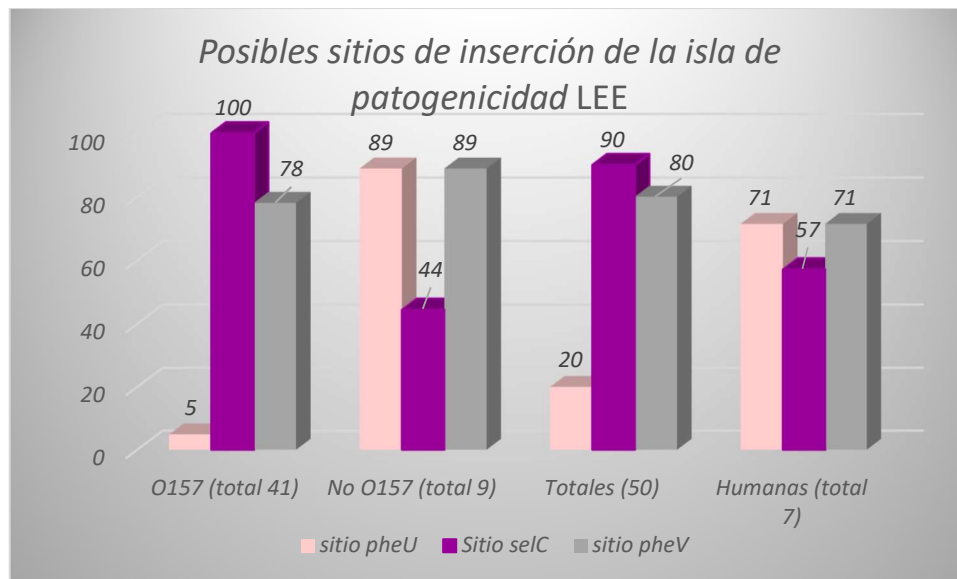


Gráfico 8. Ocupación de los posibles sitios de inserción de la Isla de patogenicidad LEE, discriminados por serogrupo O157 y no-O157 y aislamientos de origen humano e informados como porcentaje dentro de cada grupo en los aislamientos locales.

CAPÍTULO 3

CAPÍTULO 3. Estudios de susceptibilidad/resistencia a antimicrobianos

Como se mencionó anteriormente el uso excesivo de antibióticos en medicina humana y veterinaria aporta presión para la selección y consecuente circulación de bacterias resistentes. En este sentido las cepas STEC resistentes, generan preocupación a la salud pública mundial (Mir *et al.*, 2019). Si bien el tratamiento antibiótico en los casos clínicos de las infecciones producidas por las STEC es controvertido, algunos autores desaconsejan su uso en la etapa de SUH (Wong *et al.*, 2000; Freedman *et al.*, 2016), mientras que otros apoyan el uso de antibióticos como gentamicina, azitromicina, fosfomicina y meropenem en el tratamiento de infecciones humanas por STEC para evitar el desarrollo de las enfermedades más graves (Ikeda *et al.*, 1999; Nitschke *et al.*, 2012; Mir *et al.*, 2019; Joseph *et al.*, 2020). Esto abre la posibilidad de un posible régimen de tratamiento para la infección por STEC usando una terapia que combina antibióticos, un inhibidor transcripcional o inhibidores de la síntesis proteica (no se sintetizaría la nucleasa entre otras enzimas, STEC no entraría en ciclo lítico y no habría producción importante de Stx), suministrado antes de o simultáneamente con un antibiótico como la ciprofloxacina, que elimina eficazmente la infección bacteriana.

Por esto es importante conocer el perfil de sensibilidad o resistencia a los antibióticos, teniendo en cuenta la capacidad de *E. coli* para adquirir genes por el mecanismo de transferencia horizontal tanto con integrantes de la microbiota intestinal humana, como del ganado bovino, que como hemos mencionado anteriormente constituye el principal reservorio de este patógeno (Pistone *et al.*, 2005; Terajima *et al.*, 2017).

El objetivo del presente capítulo fue conocer los perfiles de sensibilidad/resistencia a antibióticos de uso común en medicina humana y veterinaria en este grupo de cepas de STEC, y detectar los genes posiblemente implicados.

Metodología

Perfiles de sensibilidad/resistencia

Los perfiles de sensibilidad/resistencia a un conjunto de antimicrobianos de uso veterinario y humano se establecieron por la técnica de disco-difusión en agar, de acuerdo con las recomendaciones del CLSI (CLSI, 2019).

Las cepas se cultivaron en Mac Conkey Sorbitol (Oxoid) a 35-37°C durante 24 horas. 4 o 5 colonias idénticas se suspendieron en 5 ml de solución salina fisiológica estéril al 0,9% hasta alcanzar una turbidez de 0,5 McFarland. Usando un hisopo estéril; la suspensión así obtenida se sembró en placas con agar Muller-Hinton (Oxoid). Se colocaron discos que contenían los antimicrobianos seleccionados (Oxoid), y se incubaron a 35-37°C durante 18-24 horas en aerobiosis.

Se determinaron los diámetros de los halos de inhibición del crecimiento bacteriano alrededor de los discos, posteriormente se volvieron a incubar las placas en las mismas condiciones y se volvió a realizar la lectura de las mismas a las 48 horas.

Los antibióticos ensayados fueron los siguientes: Cetriaxona (CRO), Cefoxitina (FOX), Cefepime (FEP), Cefuroxime (CXM), Amoxicilina – Acido Clavulánico (AMC), Ceftazidime (CAZ), Fosfomicina – trometamol (FOT), Ciprofloxacina (CIP), Gentamicina (CN), Ampicilina (AMP), Amicacina (AK), Trimetropim sulfametoxazol (SXT), Meropenem (MEM) e Imipenem (IPM).

La interpretación se realizó de acuerdo con los puntos de corte CLSI 2019 (ver anexo III). Se utilizó *E. coli* ATCC 25922 como control.

Búsqueda de genes relacionados a resistencia antimicrobiana

A partir de los genomas secuenciados y ensamblados según los procedimientos que se presentan en el capítulo 5 se realizó la búsqueda de genes que podrían estar relacionados a la resistencia antimicrobiana en bacterias. Para ello se utilizaron las bases de datos Resfinder 4.1 (Bortolaia *et al.*, 2020) <https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/> donde se pueden encontrar principalmente genes de resistencia adquirida (último acceso setiembre de 2020) y CARD (Alcock *et al.* 2020) <https://card.mcmaster.ca/analyze/rgi> que reporta principalmente genes que en general son propios de la bacteria y por mutaciones pueden provocar resistencia.

Resultados y Discusión

Perfiles de sensibilidad/resistencia

En la tabla 14 se presentan los resultados de los perfiles de sensibilidad/resistencia de los aislamientos locales ensayados.

Tabla 14. Perfiles de sensibilidad/resistencia de los aislamientos locales estudiados.

CÓDIGO AISLAMIENTO	AMOXICILINA ACIDO CLAVULÁNICO	CEFTAZIDIME (CAZ)	CEFOXITINA (FOX)	FOSFOMICINA - TROMETAMOL (FOT)	CEFUROXIME (CXM)	CEFTRIAXONA (CRO)	CEFEPIME (FEP)	GENTAMICINA (CN)	TRIMETROPIM SULFAMETOXA ZOL (SXT)	MEROPENEM (MEM)	IMPENEM (IPM)	CIPROFLOXACINA (CIP)	AMPICILINA (AMP)	AMICACINA (AK)
1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
3	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
4	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
6	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
7	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
8	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
9	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
10	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
12	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
13	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
14	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
15	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
16	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
17	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
18	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
19	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
20	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
21	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
23	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
24	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
25	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
27	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
28	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
29	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
30	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
31	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
34	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
36	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
39	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
40	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
41	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	R	S
42	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
43	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
44	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
45	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
46	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
47	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
48	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
49	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

50	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
51	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
52	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
54	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S
56	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
60	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
61	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
67	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S
68	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S
69	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S

El 10% de los aislamientos STEC estudiados presentaron resistencia a alguno de los antibióticos probados. En la tabla 15 se presentan las características de las cepas que presentaron resistencia discriminadas de acuerdo a su origen, serogrupo y año de aislamiento. La distribución de antibiótipos fue la siguiente (AMP, SXT, CN) R, 1 aislado; (AMP, STX) R, 3 aislados; y (AMP)R, 1 aislado. Como puede observarse la resistencia a ampicilina fue observada en todas las STEC resistentes (n = 5); además, 3 aislados también fueron resistentes a trimetoprim-sulfametoxazol y uno a gentamicina. La beta-lactamasa TEM-1 es la enzima más prevalente responsable de la resistencia a ampicilina en bacterias gramnegativas y los genes codificantes generalmente se encuentran en elementos genéticos móviles.

Como puede observarse en la tabla 15, de las 7 cepas STEC recuperadas de casos clínicos: 3 provenientes de ITU, diarrea con sangre y diarrea sin sangre (serogrupos O157, O26 y O153, respectivamente) y 4 procedentes de SUH (serogrupos O145 (2), O26 (1), O111 (1)), solo 2 presentaron resistencia lo que corresponde a un 28,57%. Cabe destacar que ambas cepas resistentes fueron aisladas de SUH. De las 39 cepas aisladas de alimentos (serogrupos O157 (38), O103 (1)), solo una presentó resistencia (2.56%). En ganado de cuatro serogrupos recuperados (O157 (2), O26 (2)), se determinó resistencia en dos cepas del serogrupo O26 (50%). Si hacemos el análisis por serogrupo dentro de las cepas que presentaron resistencia, el 60% corresponden al serogrupo O26, pero dado el bajo número de aislados resistentes no

se pueden generalizar estas observaciones con una significancia estadística.

Con respecto a las resistencias antimicrobianas encontradas, si realizamos el análisis por serogrupos podemos observar que los aislamientos del serogrupo O26 obtenidos tanto de un caso clínico de SUH como de ganado y con 3 años de diferencia (ambos del ST21 y agrupados en el mismo pulsogrupo, ver tabla 21 e imagen 9), presentaron el mismo perfil de resistencia (tabla 15). Solo un aislado de los 41 STEC O157 fue resistente, lo que corresponde a un 2.4%, mientras que 4 aislamientos de los 9 aislados de STEC no-O157 presentaron algún tipo de resistencia (44.4%). Estos resultados son concordantes con trabajos anteriormente reportados que afirman que las cepas no-O157 presentan mayor capacidad de adquisición de genes por transferencia horizontal, incluyendo genes de resistencia (Sasaki *et al.*, 2012).

Tabla 15. Perfiles de sensibilidad/resistencia de los aislamientos locales estudiados discriminados según su origen, serogrupo y año de aislamiento. S: sensible

Antibiótipo	Origen			Serogrupo	Año
	Humano	Alimentos	Animal		
S	5	38	2		
CN, SXT, AMP		1		O157:H7	2005
SXT, AMP			2	O26	2010
SXT, AMP	1			O26	2013
AMP	1			O111	2017

La tasa global de resistencia encontrada en este conjunto de STEC (10%) sugiere que su contribución al problema de la resistencia a los antimicrobianos es baja y similar a la observada en Argentina (2% en La Plata (Oderiz *et al.*, 2018) y mucho menor que la reportada en Brasil (Assumpção *et al.*, 2015). Sin embargo, hay que tener en cuenta que los genes responsables, probablemente se encuentren ubicados en integrones de clase 1, pudiendo ser fácilmente transferidos a otras bacterias Gram-negativas intestinales, como lo demuestran los trabajos de Nagachinta y Chen del 2009 y 2008 (Nagachinta y Chen, 2008; Nagachinta y Chen, 2009). Estos autores sugieren que las cepas STEC podrían servir como fuente de genes

de resistencia a antibióticos diseminados por conjugación a células susceptibles de otras cepas de *E. coli* en un ambiente agrícola. Resultados similares fueron obtenidos en los trabajos de Cocchi *et al.* (2007) y Colello *et al.* (2018); los autores estudiaron aislamientos de muestras humanas y animales y muestras de varios orígenes como animales, alimentos y ambientes agrícolas, respectivamente.

Dado que a nivel mundial son numerosas las investigaciones que reportan grandes cantidades de fagos portadores de genes de resistencia a antibióticos en muestras con contaminación fecal tanto humana como animal, así como fagos que transportan genes de β -lactamasas (CTXM y TEM) y sumado al hecho de que los genes de β -lactamasas detectados en fagos son activos, y su transferencia genera resistencia a antibióticos β -lactámicos en *E. coli*, resultaría de interés, realizar estudios en diferentes ambientes y en los alimentos, en relación a los bacteriófagos circulantes en nuestro país (Colomer-Lluch *et al.*, 2011a; Colomer-Lluch *et al.*, 2011b; Imamovic y Muniesa, 2011).

Búsqueda de genes relacionados a resistencia antimicrobiana

En la tabla 16 se presentan los dos aislamientos que portaron genes de resistencia en Resfinder; la tabla con los resultados para los 10 aislados analizados se encuentra en el Anexo VI. De los aislados que presentaron resistencia en los ensayos de disco difusión, solo fue secuenciada la cepa de *E. coli* 69 (serogrupo O111, aislado de un niño con SUH resistente a ampicilina), y los genes de resistencia encontrados fueron: *blaTEM-1B*, *sul2*, *tet(A)* *mdfA*, *mphB*, *mef(A)*, *aph (3'') - Ib*, *aph (3') - Ia*, *aph (6) -Id* (identidad 100%, y del tamaño del gen de referencia). Estos genes están relacionados a resistencia a ampicilina, tetraciclina y aminoglucósidos (Bortolaia *et al.*, 2020), y generalmente se ubican en integrones de clase 1,

como ya lo reportaron Colello *et al.* (2018), en un estudio realizado en cepas de STEC recuperadas de animales en la Argentina.

No encontramos estos genes en los otros 9 STEC susceptibles secuenciados. Cabe aclarar que la sola presencia de un gen relacionado a la resistencia a un determinado antibiótico, no implica que la bacteria que lo porta tenga dicha resistencia. Sin embargo, la presencia de un gen de resistencia en un aislado puede afectar el resultado clínico de la terapia antimicrobiana. Por ejemplo, los países europeos han utilizado macrólidos como la azitromicina en el tratamiento de STEC en las primeras etapas de la infección humana, sin ninguna inducción de la expresión de la toxina Shiga, pero el gen *mph* (A) que confiere resistencia a la azitromicina podría evitar la aplicación exitosa de esta terapia. Los genes más comunes observados en STEC que se aíslan de humanos son, *blaTEM-1*, *strA*, *strB*, *sul1*, *sul2*, *dfrA* y *tet* (A) mientras que *floR*, *ampC*, *tet* (A), *blaTEM* y *sul1* han sido identificados en aislados de STEC bovinos recuperados de granjas y mataderos. Además, la resistencia a antibióticos como ampicilina, gentamicina, estreptomina, sulfisoxazol, tetraciclina, y trimetoprim-sulfametoxazol se ha asociado con presencia de integrones de clase 1 (Mir *et al.*, 2020).

Por otra parte, se encontró que la cepa de *E. coli* 52 (O145:H25) susceptible a todos los antibióticos probados, portaba el gen *fosA7*, asociado con resistencia a la fosfomicina. El gen presentó 100% de Id con el gen de referencia que usa Resfinder, pero con menor tamaño, lo cual podría explicar el hecho de no haberse observado esta resistencia en los ensayos fenotípicos de laboratorio. Este aislamiento también presentó el gen *mdf(A)* según esta base de datos. MdfA es un transportador de múltiples fármacos impulsado por el gradiente electroquímico de protones: es una bomba de eflujo para antibióticos como cloranfenicol, eritromicina y ciertos aminoglucósidos y fluoroquinolonas (Edgard & Bibi, 1997).

Tabla 16. Genes de resistencia adquirida encontrados en cepas locales de STEC, antimicrobiano relacionado y código de match. (Match 2 indica 100% de ID y menor largo que el gen de referencia, match 3 indica 100% de ID e igual largo con el gen de referencia).

CEPA	ANTIMICROBIANO	MATCH	BACKGROUND GENETICO GEN (NUMERO DE ACCESO)
<i>E. coli</i> 52	Fosfomicina	No mostrado	<i>mdf(A)_Y08743</i>
		2	<i>fosA7 (fosA7_LAPJ01000014)</i>
<i>E. coli</i> 69	Ribostamicina	3	<i>aph(3')-Ia (aph(3')-Ia_V00359)</i>
	Kanamicina	3	<i>aph(3')-Ia (aph(3')-Ia_V00359)</i>
	Paromomicina	3	<i>aph(3')-Ia (aph(3')-Ia_V00359)</i>
	Streptomycinina	3	<i>aph(3'')-Ib (aph(3'')-Ib_AF321551),</i>
			<i>aph(6)-Id (aph(6)-Id_M28829),</i> <i>aph(6)-Id (aph(6)-Id_AF024602)</i>
	Lividomicina	3	<i>aph(3')-Ia (aph(3')-Ia_V00359)</i>
Neomicina	3	<i>aph(3')-Ia (aph(3')-Ia_V00359)</i>	

Los 10 genomas analizados con la base CARD presentaron en el entorno de 50 genes que podrían estar relacionados a resistencia antimicrobiana; muchos de estos genes forman parte del genoma de *E. coli* y por mutaciones pueden conferir esas resistencias como es el caso de las bombas de eflujo. Los genes encontrados fueron los siguientes: *mdtM*, *CRP*, *YojI*, *PmrF*, *acrB*, *emrY*, *evgS*, *E. coli ampC1* beta-lactamase (sin el promotor), *acrD*, *E. coli ampC* beta-lactamase, *mdtN*, *mdtO*, *mdtP*, *emrA*, *rsmA*, *E. coli mdfA*, *kdpE*, *AcrE*, *ugd*, *mdtA*, *mdtB*, *mdtC*, *baeS*, *baeR*, *TolC*, *K. pneumoniae KpnE*, *K. pneumoniae KpnF*, *mdtH*, *E. coli emrE*, *Haemophilus influenzae PBP3*, *E. coli GlpT*, (con mutación confiere resistencia a fosfomicina), *E. coli EF-Tu*, *E. coli acrR*, *E. coli soxR*, *E. coli soxS*, *E. coli mar*, *E. coli ampH* beta-lactamase, *E. coli acrA*, *emrK*, *evgA*, *eptA*, *emrR*, *emrB*, *AcrS*, *marA*, *msbA*, *bacA*, *cpxA* y *H-NS*. El detalle de los mecanismos de resistencia con los que podría estar relacionado cada gen, así como la

identidad y el largo del mismo en comparación con el de referencia de la base, se presentan en el anexo VII. Los posibles antibióticos relacionados no se presentaron para cada gen dada la extensión de la información. En resumen, 35 de estos genes están relacionados a bombas de eflujo, tres se relacionan a mecanismos de inactivación del antibiótico, nueve están vinculados a alteraciones del sitio blanco del antibiótico, y tres a combinaciones de ambos mecanismos. Las clases de drogas relacionadas a los genes encontrados en los genomas de aislados locales fueron; fluoroquinolona, lincosamida, colorante de acridina, macrólido, cefalosporina, tetraciclina, rifamicina, triclosán, aminoglucósido, cloruro de benzalconio, rodamina, cefamicina, aminocolidemarina, cefamicolidemarina y nitroimidazol.

La presencia de estos genes de resistencia, incluso en aislamientos susceptibles, sugiere que estos patógenos zoonóticos contribuyen con el problema de la resistencia a los antimicrobianos. Los resultados obtenidos aportan conocimientos sobre frecuencia de resistencia y tipo de genes presentes en un conjunto de aislados de STEC, destacando el papel local de STEC como reservorio de genes de resistencia transferibles.

CAPÍTULO 4

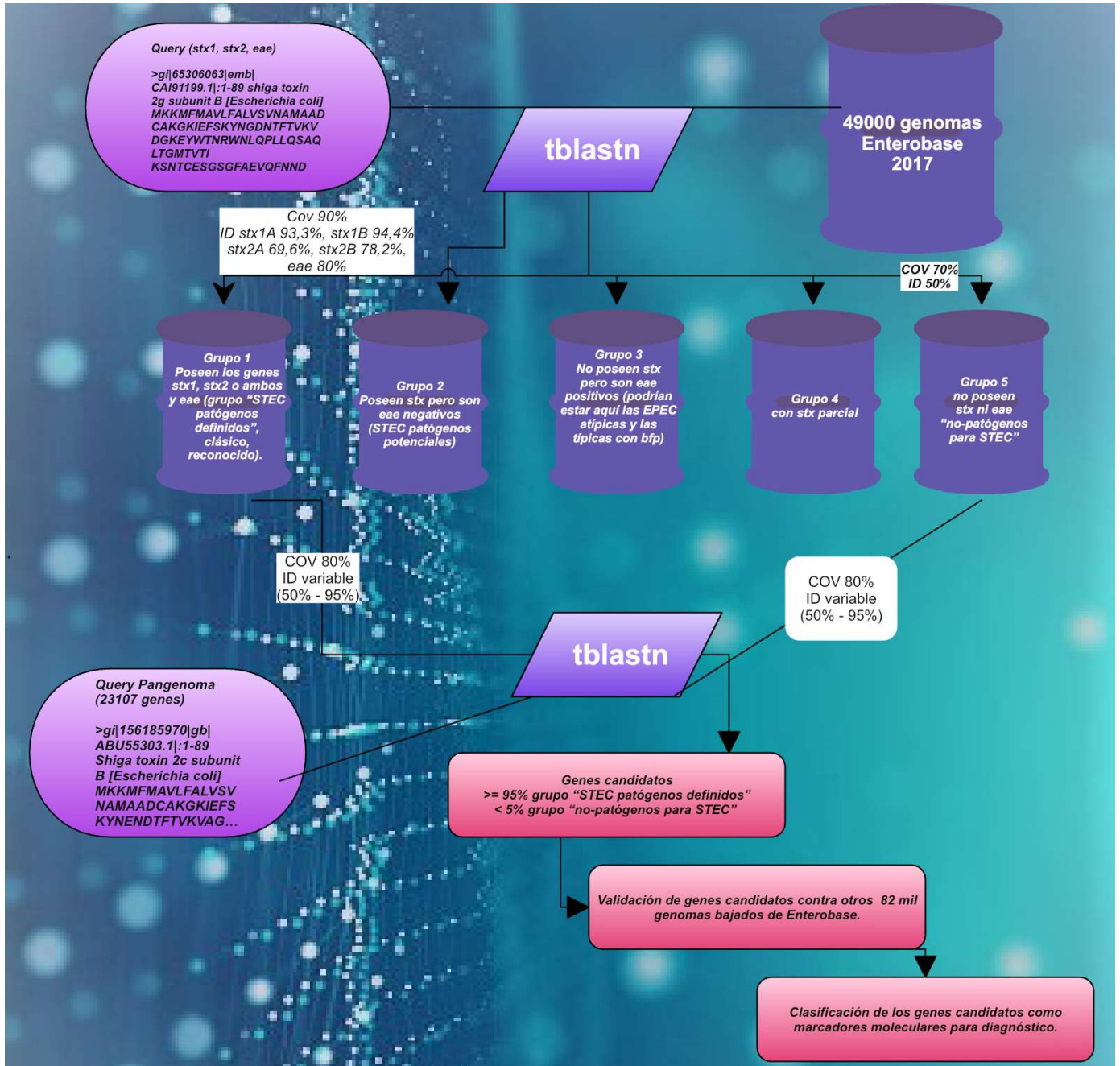
CAPÍTULO 4. Estudio bioinformático de STEC para buscar genes relacionados a patogenicidad, marcadores moleculares para diagnóstico, y validación de los mismos

En el presente capítulo se presenta el estudio genómico de *E. coli*, basado en una aproximación que utiliza únicamente herramientas bioinformáticas, cuyo objetivo fue identificar genes relacionados a la patogenicidad que permitan inferir mecanismos de acción, así como secuencias blanco (genes) que puedan ser usados como marcadores moleculares asociados a STEC.

Metodología

Identificación de genes candidatos como posibles marcadores moleculares asociados a STEC

A continuación, se presenta un esquema de la metodología empleada (ver esquema 2).



Esquema 2. Metodología empleada en el diseño de marcadores moleculares.

Construcción de una base local e identificación de genes *stx* y *eae* para clasificar los genomas

Se bajaron 49.000 genomas de *E. coli* libremente disponibles en la base Enterobase (<https://enterobase.warwick.ac.uk/>) a mayo de 2017. Con estas secuencias se creó una base de datos en formato BLAST nucleotídica para poder realizar la búsqueda de secuencias (Altschul *et al.*, 1990).

Para la clasificación de los genomas (cepas) se realizó una búsqueda mediante tBLASTn de los genes *stx1*, *stx2* y *eae* en los mismos (Altschul *et al.*, 1990). Primero se construyeron los Query con las secuencias aminoacídicas de las variantes de los genes *stx* para las subunidades A y B (3 para *stx1* (variantes a, c y d) y 7 para *stx2* (variantes a, b, c, d, e, f, g), y con 20 variantes del gen *eae*.

Para el caso de los genes *stx1* y *stx2* subunidades A y B, se obtuvieron las secuencias realizando un *blast* con los cebadores descritos en el trabajo de Scheutz *et al.*, 2012 (ver tabla 17).

Tabla 17. Secuencias utilizadas para definir el *query* de *stx1* y *stx2* y realizar la búsqueda de los genes

<i>Gen</i>	<i>Variable*</i>	<i>Cepa Referencia**</i>	<i>Fuente***</i>	<i>Subunidad****</i>	<i>Numero de acceso*****</i>
<i>stx1</i>	A	EDL 933	Scheutz <i>et al.</i> , 2012	A	667692802
	C	BCN26 Shiga-toxin1C sub A	NCBI	A,B	90969033/90969034
	D	MHI813 Sub A y B	Scheutz <i>et al.</i> , 2012	A,B	28192583/28192584
<i>stx2</i>	A	VTB60	Scheutz <i>et al.</i> , 2012	A,B	49425225/49425226
	B	O3-08304	NCBI	B	294719683
	C	O6-5121	Scheutz <i>et al.</i> , 2012	A,B	156185969/156185970
	D		Scheutz <i>et al.</i> , 2012	A,B	1020994390/1020994391
	E		Scheutz <i>et al.</i> , 2012	A,B	295083292/295083293
	F	P2660	Scheutz <i>et al.</i> , 2012	A,B	1067639111/1067639112
	G		Scheutz <i>et al.</i> , 2012	A,B	65306062/65306063

*variable del gen, **cepa de referencia de la cual se obtuvo la secuencia, ***lugar donde se obtuvo el numero de acceso****subunidad del gen que amplifica*****numero de acceso (Gi) en NCBI.

Para el caso del gen *eae*, se bajaron las variantes descritas previamente (Blanco *et al.*, 2005) utilizando los números de accesos que figuran en el mismo. Se incluyeron en el análisis todas las variantes descritas hasta ese momento: $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, $\xi R/\beta 2B$, $\xi R/\beta 2B$, $\delta/\beta 2O$, κ , $\gamma 1$, $\gamma 2/\theta$, $\epsilon 1$, νR , ξ , $\eta 1$, $\eta 2$, $\tau 1$, $\mu R/t 2$, λ , μB , νB y ξB .

Posteriormente se realizaron las búsquedas en base a similitud en la base de datos con 49.000 genomas con la herramienta tblastn (Altschul *et al.*, 1990). Los parámetros para considerar la similitud fueron una cobertura mínima del 90% y para cada una de los genes, *stx1A*, *stx1B*, *stx2A*, *stx2B* y *eae* se utilizó un valor de corte de identidad basado en la variabilidad observada en los trabajos en donde se describen las variables. Esta similitud entre las diferentes variantes de los genes *stx* y *eae* respectivamente se calculó utilizando el programa MEGA7 (Kumar *et al.*, 2016) (disponible en <https://www.megasoftware.net/>). Se definió así el grupo de los “STEC patógenos”, el cual quedó estrictamente definido. Para el grupo de los “no-patógenos para STEC”, se bajó la identidad al 50 % y la cobertura al 70 %, es decir se bajaron los parámetros que relajan las restricciones de búsqueda. De esta forma tenemos mayor certeza de que los genomas negativos son efectivamente negativos.

En base a la presencia de los genes *stx1* y *stx2* y el gen *eae* los genomas bajados de Enterobase se clasificaron en grupos arbitrarios de acuerdo a los siguientes criterios:

Grupo 1. Poseen los genes *stx1*, *stx2* o ambos *stx1/stx2* y son *eae+* (se definió así el grupo de los “STEC patógenos”, el cual quedó estrictamente definido) y sobre los cuales se van a definir las secuencias candidatas a ser utilizadas como marcadores moleculares.

Grupo 2. Poseen los genes *stx1*, *stx2* o ambos *stx1/stx2* y son *eae-* (siendo estas cepas consideradas “STEC patógenos potenciales” (hay que destacar que se pueden encontrar en

este grupo serogrupos o serotipos asociados a brotes de enfermedad severa en humanos como por ejemplo la O104:H4 del brote de Alemania, O91 no móvil, O113:H21, O174 (Beutin *et al.*, 2012; Bielaszewska *et al.*, 2011).

Grupo 3. Los genomas que no poseen *stx*, pero sí presentan *eae+*. En este grupo se encuentran los aislamientos de EPEC atípicas, las cepas STEC que pudieron haber perdido los genes *stx*, (STEC LST, del inglés STEC Lost the Shiga toxin), los EPEC típicos, y las cepas híbridas EPEC/EPEC y ExPEC/ EPEC (Bielaszewska *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2020).

Las cepas EPEC se clasifican en dos subtipos, típicas y atípicas basados en la presencia o ausencia del plásmido del factor de adherencia de *E. coli* (pEAF) respectivamente. El no haber usado el gen *bfp* u otro marcador para este plásmido no nos permitió realizar esta diferenciación (Trabulsi *et al.*, 2002).

Grupo 4. Los genomas que presentaron *stx* parcial, sea por poseer una sola subunidad o una fracción del gen, esto puede deberse a que perdieron esa parte del gen o a que están mal ingresados (algunos de estos podrían corresponder al grupo 2).

Grupo 5. No poseen los genes *stx1*, *stx2* ni *eae*. Los genomas que no presentaron ninguno de los tres genes, estos son definidos como “Otros *E. coli*” (no patógenos para STEC) y aquí pueden estar los *E. coli* comensales, otros virotipos diarreogénicos no híbridos (ETEC, EIEC, EAEC, AIEC) y cepas de *E. coli* patógeno extraintestinal como UPEC y MAEC “no heteropatógenos”.

Los genes que estamos buscando deberían estar en el 95% o más de los genomas del grupo 1 y en el 5% o menos de los genomas del grupo 5. Estrictamente hablando, nuestros genes candidatos estarían asociados a la presencia de los genes *stx* y *eae* y no a la patogenicidad. Esta

asociación puede ser funcional o de ligamiento físico. La aproximación es válida si se considera que, aunque no es la patogenia lo que podemos asociar, la presencia de los genes *stx* y *eae* es lo que se utiliza para definir la presencia de los patógenos en muestras.

Búsqueda de genes candidatos

Se obtuvo el Pangenoma y el genoma conservado (*core genome*) de *E. coli* del trabajo previo y disponible en PAN-X:Pan-genome Web (pangenome.tuebingen.mpg.de) (Ding *et al.*, 2018). Para definir la presencia o ausencia de genes se utilizó como punto de partida el pangenoma definido para la especie (23107 genes). Se realizó una búsqueda en base a identidad utilizando el programa tblastn contra la base de genomas de *E. coli* construida previamente (49000 genomas). A partir de los resultados se analizó la frecuencia de aparición de los genes en los genomas de los diferentes grupos (1 a 5). El objetivo fue identificar genes que al mismo tiempo estén presentes en el grupo “STEC patógenos definidos” (grupo 1), con una frecuencia de aparición de 95% o mayor, y ausentes en el grupo 5 “Otros *E. coli*”, o presentes con una frecuencia de aparición menor al 5%. Hay que tener en cuenta que en esta oportunidad dejamos afuera las cepas STEC *eae*- (grupo 2) que como vimos algunas pueden estar asociadas a enfermedades severas. Esta situación pone de manifiesto nuevamente la plasticidad y evolución del genoma de *E. coli* y destaca las limitaciones de cualquier análisis fenológico o genotípico que intente definir de manera permanente factores de virulencia (*E. coli* como otras bacterias están siempre en construcción y sometidas a presión de selección).

La presencia de un gen en un genoma se definió en base al resultado positivo del tblastn, con un mínimo de 80% de cobertura. Los valores de identidad se fueron variando entre 50% y 95%, con pasos de 5%. Para cada valor de identidad se definieron los genes o grupos de genes que eran candidatos. Este diseño permite explorar la posibilidad de que distintos grupos de

homólogos, definidos con distintos grados de variabilidad, estén asociados a la condición de estudio (presencia en el mismo genoma de los genes *stx* y *eae*). Se incluye la posibilidad de que la función asociada presente distinto rango de conservación. Se construyeron así tablas de genomas vs. genes (grupo de homólogos) para cada valor de identidad y para cada grupo de genomas previamente definido.

Se identificaron genes candidatos a ser usados como marcadores moleculares, genes que se presentaron a una alta frecuencia en el grupo de los genomas “STEC patógenos definidos” (grupo 1) y baja frecuencia en el grupo “Otras *E. coli*” (grupo 5).

Para cada marcador candidato se obtuvo la frecuencia de aparición a los diferentes valores de identidad, y se construyeron tablas de valores de frecuencia vs. Identidad.

Estudio de los genes candidatos: identificación funcional en base a homología, distribución taxonómica y clasificación de los mismos

A los efectos de analizar a qué correspondían los genes candidatos se realizaron por blastn contra la base de datos del NCBI. Se buscó en cada caso la ruta o mecanismo en el que cada gen estaba implicado o si la secuencias correspondía a una proteína hipotética. Además, se identificó una distribución taxonómica tentativa.

Se definieron una serie de criterios de selección de marcadores (para PCR y/o secuenciación), se evaluó el interés biológico de cada gen y su posible asociación con genes ya descriptos relacionados a patogenicidad.

Criterios para clasificar los genes candidatos como posibles marcadores moleculares

Genes no considerados como marcadores

- 1) Genes que aparecen en otras especies con alta identidad (> 65%) (resaltados en azul en la tabla 19 y en el anexo IV).

Genes considerados como marcadores (que requieren diseño de primers específicos para la especie)

- 2) Genes que presentan una identidad >80% con los genomas de *E. coli* reportados. Aquellos genes que presenten alta identidad (>80%) y baja o nula identidad con otras especies (<65%) se indican en violeta en las tablas 19 y 20 y en el anexo IV.

Genes considerados como marcadores (que no requieren diseño de primers específicos para la especie)

- 3) Buenos marcadores: los que aparecen solo en *E. coli* y con identidad mayor al 80% (marcados en verdes), (secuencias conservadas) (tablas 19 y 20).
- 4) Posibles marcadores, los que aparecen solo en *E. coli*, pero con ID menor al 80 (color asignado en el código amarillo) (secuencias variables).
- 5) Posibles marcadores, aparecen en *E. coli* y en *E. albertii* con alta id mayor al 80% (destacados en grises) (tablas 19 y 20).

Validación de genes candidatos

Con el objetivo de validar los genes candidatos, se descargaron 82257 genomas de Enterobase (<http://enterobase.warwick.ac.uk/>, actualizada a febrero de 2020). Los mismos representaban todos los genomas nuevos de la base, es decir que no se incluyeron los genomas que se utilizaron para la búsqueda de los genes candidatos.

Se creó una base local con los nuevos genomas, los cuales fueron clasificados de la misma forma, en los cinco grupos que incluían los “STEC patógenos definidos” (grupo 1) y “Otras *E. coli*” (grupo 5), posteriormente se realizó un tblastn con los genes candidatos con toda esta base. Aquellos que aparecieron en el grupo definido como “STEC patógeno definido” en un 95% y menos de un 5% en el grupo “Otras *E. coli* (no-patógeno para STEC)” (grupo 5) en alguno de los rangos de variabilidad, establecidos anteriormente, fueron los genes que pasaron la validación.

Con los genes que pasaron la validación y cumplieron los criterios para ser considerados como marcadores moleculares en diagnóstico y a su vez correspondieron a proteínas hipotéticas, se volvió a realizar tblastn en NCBI, para ver si la secuencia correspondía a un gen completo y para evaluar si estaba de forma directa o en reverso complementario.

Resultados y Discusión

Identificación de genes candidatos a ser utilizados como marcadores moleculares asociados a STEC

Construcción de una base local y *blast* con genes *stx* y *eae* para clasificar los genomas

Los 49000 genomas utilizados para la construcción de una base presentaron una distribución de sus números de *contigs* y sus N50 como se muestra en los gráficos 9a y 9b respectivamente.

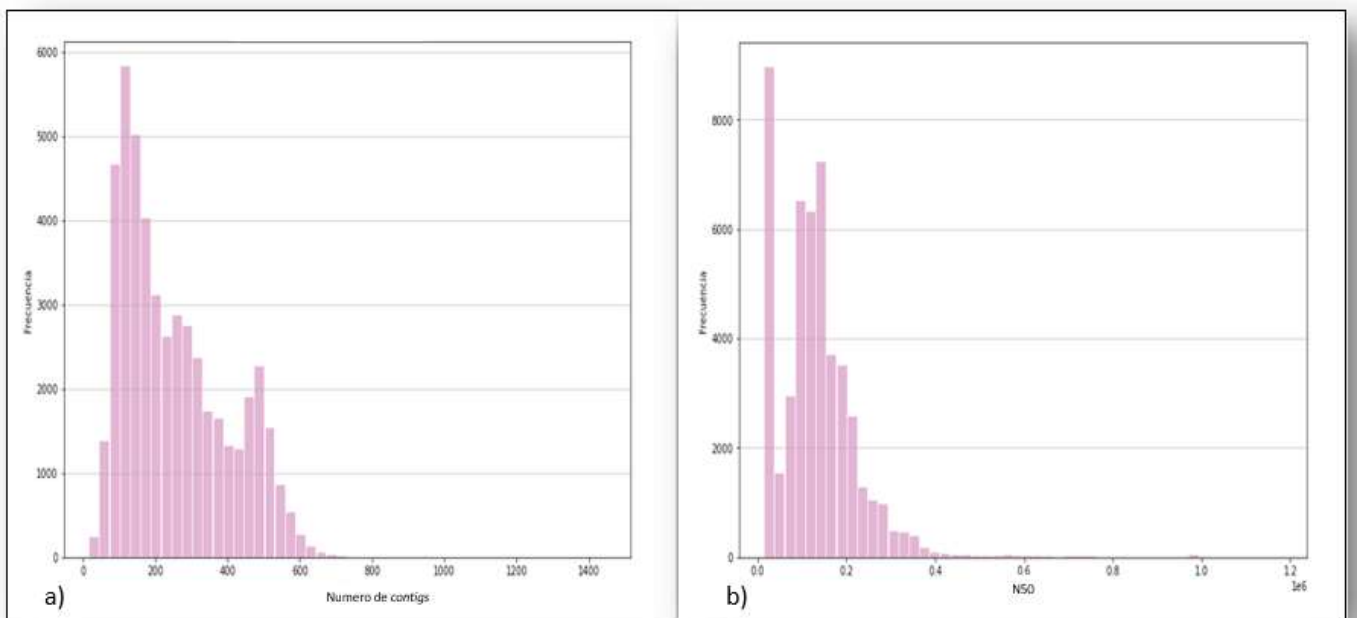


Gráfico 9. Distribución del número de contigs (a) y del N50 (b) de los 49000 genomas.

Hay que tener en cuenta que los genomas de *E. coli* ingresados a EnteroBase seguramente tienen un sesgo (asociados a cuadros más severos, cepas resistentes, interés económico o de laboratorios, epidemiología particular, etc.) y que seguramente no representan todo el universo de *E. coli*.

Los análisis de secuencia entre las diferentes variantes de las subunidades (A y B) de *stx1* y *stx2*, reportadas por Scheutz *et al.*, 2012, dieron como resultado una alta similitud. En el caso de *stx1*, esto se observó en ambas subunidades, identidad mayor al 93% en todos los casos (*stx1A* 93.3% y *stx1B* 94.4%), mientras que para el gen *stx2* la identidad fue mayor al 69% (*stx2A* 69.6 % y *stx2B* 78.2 %).

Se determinó la distribución de los genes *stx1* y *stx2*, subunidades A y B, en cada uno de los genomas de la base (ver tabla 18). 8255 genomas presentaron el gen *stx1* (subunidades A y B), 6645 genomas presentaron el gen *stx2* (subunidades A y B), 2559 genomas presentaron ambos genes con sus dos subunidades, 12341 genomas presentaron el gen *stx1*, el gen *stx2*, o ambos, estos genomas corresponderían a cepas potencialmente patógenas por poseer los genes *stx* que codifican para la toxina Shiga.

Los análisis de variabilidad entre las diferentes variantes de los genes *eae* dieron como resultado una identidad mínima del 80%. Se determinó que 13135 genomas presentaron el gen *eae* en alguna de sus 20 variantes descritas hasta el momento.

Recordemos que la presencia de estos genes es el criterio utilizado para definir aislamientos STEC en el control de los productos cárnicos que ingresan en algunos mercados como el estadounidense. Se analizaron cuáles genomas contaban con los genes, (*stx* subunidades A y B y *eae*). Como resultado se identificaron 10399 genomas como potencialmente patógenos (grupo 1), y 35883 genomas no patógenos para STEC (grupo 5), sobre los cuales se buscaron secuencias candidatas a ser usadas como marcadores moleculares que apoyen el diagnóstico de cepas STEC *eae* positivas (definidas aquí como del grupo 1).

La búsqueda de estos genes mediante blast requirió un elevado tiempo de cómputo, y esto está relacionado con el gran número de genomas que se incluyeron en las bases.

Tabla 18. Distribución de los genes *stx1* (subunidad A y B), *stx2* (subunidad A y B), y *eae* en el conjunto de genomas presentes en Enterobase a mayo de 2017.

Numero de genomas	Gen	Subunidad
8261	<i>stx1</i>	A
8277	<i>stx1</i>	B
8255	<i>stx1</i>	AB
6679	<i>stx2</i>	A
7805	<i>stx2</i>	B
6645	<i>stx2</i>	AB
2559	<i>stx1</i> y <i>stx2</i>	AB
12341	<i>stx1</i> , <i>stx2</i> o <i>ambos</i>	AB
13135	<i>eae</i>	--
7208	<i>stx1</i> AB y <i>eae</i>	AB
5344	<i>stx2</i> AB y <i>eae</i>	AB
2153	<i>stx1</i> AB, <i>stx2</i> AB y <i>eae</i>	AB
10399	<i>stx</i> y <i>eae</i>	AB
1047	<i>stx1+</i> y <i>eae-</i>	AB
1301	<i>stx2+</i> y <i>eae-</i>	AB
406	<i>stx1</i> , <i>stx2</i> y <i>eae-</i>	AB
33902	<i>sin stx1</i> , <i>stx2</i> ni <i>eae</i>	AB
35544	<i>sin stx</i>	AB
1642	<i>sin stx</i> y <i>eae+</i>	AB

Genes candidatos

Se encontraron 126 secuencias candidatas, es decir que en al menos un rango de identidad (conservación) definido, cumplen con la condición de estar presente en el 95 % de los genomas “STEC patógenos definidos” (grupo 1) y en menos de un 5 % de los genomas definidos como (“Otras *E. coli*” no-patógenos para STEC) (grupo 5). Los marcadores candidatos se presentan en el anexo IV donde se observa el código interno del gen, la función potencial para los genes que estaban anotados y un color que se definió según los criterios previamente establecidos. Cabe destacar que se atribuyó el color rosado cuando el gen presentó un resultado de blast contra NCBI con pocas cepas y en rojo los genes candidatos cuya secuencia parece no encontrar identidad con genomas de *E. coli* u otra especie. Estos casos pueden asociarse con problemas de anotación de la secuencia en el pangenoma, las cuales fueron utilizadas como *queries* en el blast original. Los posibles genes candidatos también se encuentran en el Anexo V donde se muestra a que valores de identidad de secuencias (conservación) se definen. Como puede observarse 49 secuencias cumplen con los criterios definidos para ser consideradas genes candidatos a marcadores moleculares que apoyen el diagnóstico de STEC del grupo 1.

Además de ser utilizadas en diagnóstico, aquellas secuencias que cumplieron la validación, pueden servir para comprender aspectos de la biología de STEC, como por ejemplo características de virulencia. Cabe señalar que no se identificaron en el estudio genes que se presenten solo en *E. coli*, con una homología inferior al 80% (amarillos según el código de colores establecido previamente).

Validación de genes candidatos

De las 126 secuencias candidatas 40 cumplieron los criterios de validación, las cuales se presentan en la tabla 19. 39 de ellas validaron con los mismos valores de identidad que surgieron en el estudio cuando fueron determinadas como genes candidatos, (ver anexo V), mientras que la secuencia del gen zzzz.3398 que en el estudio inicial se presentaba como un candidato en los valores de identidad de 50 a 70%, validó para un rango de identidad menor del 50 a 65%. Como puede observarse en la tabla 19, siete corresponden a proteínas hipotéticas, mientras que cuatro de ellas corresponden a proteínas que contienen el dominio de función desconocida (DUF1076); 15 de ellas codifican o están relacionadas a factores de virulencia ya descriptos para STEC asociadas a SUH (EHEC), lo que en cierta forma valida la metodología aplicada en este trabajo para identificar genes candidatos. Como es sabido, estas cepas altamente virulentas poseen: i) un plásmido que porta el gen *ehxA* que codifica para una hemolisina (HlyA), ii) la isla de patogenicidad denominada LEE (*locus of enterocyte effacement*), ubicada en el cromosoma bacteriano que contiene, iii) el gen *eae* que codifica la intimina (utilizado para definir el grupo), los genes *esp* (*E. coli* secreted proteins), iv) el gen *tir* que codifica para el receptor translocado de intimina y v) los genes para la síntesis del sistema de secreción tipo III (Varela *et al.*, 2008). Ejemplos de los mismos en este trabajo son el gen que codifica para el transportador de hemolisina, *espO* y su homólogo, *espK*, *espZ*, *espB*, el receptor de intimina, *grLA*, *sepL*, *sepZ* y *escP*. También se encuentran cuatro genes que codifican para chaperonas del sistema de secreción tipo III como CesD2, CesT, CesF y CesD, también ubicados en LEE (Gaytán *et al.*, 2016).

Tabla 19. Genes candidatos que pasaron la validación.

Código del Gen	Total Score *	Query cover**	E value**	Identidad	Predicción funcional en base a homología
zzzz.10095	957	100%	0.0	100%	Subunidad de un transportador de alfa hemolisina
zzzz.10586	221	100%	2,00E-72	100%	Proteína del sistema de transferencia conjugativa tipo F TrbI [<i>Escherichia coli</i>]
zzzz.10691	958	100%	0.0	100%	Proteína de transferencia de ADN de fagos (aciltransferasa, <i>E. coli</i>)
zzzz.10990	191	100%	2,00E-61	100%	Homólogo a EspO, efector secretado por T3SS (<i>E. coli</i>)
zzzz.10991	187	97%	7,00E-60	100%	Proteína de secreción EspO [<i>Escherichia coli</i>]
zzzz.10992	360	100%	6,00E-126	100%	Proteína hipotética de Enterobacterias
zzzz.11138	107	100%	2,00E-29	100%	Proteína hipotética D4M50_02660 [<i>Escherichia coli</i>]
zzzz.11330	165	100%	2,00E-51	100%	Proteína desconocida codificada dentro del profago CP-9330 [<i>Escherichia coli</i> O157: H7 str. EDL933]
zzzz.11331	168	100%	1e-52	100%	Proteína de unión al ADN de la familia Arc [<i>Escherichia coli</i>]
zzzz.11712	933	100%	0.0	100%	Efector del sistema de secreción tipo III EspK , Gob[<i>Escherichia coli</i>]
zzzz.11713	388	100%	2,00E-136	100%	Proteasa de la proa del fago HK97 [<i>Escherichia coli</i>]
zzzz.12070	105	73%	4,00E-028	85%	Producto proteico sin nombre
zzzz.12105	136	100%	1,00E-040	100%	Proteína hipotética (<i>E. coli</i>)
zzzz.12109	281	100%	6,00E-096	100%	Chaperona CesD2 del sistema de secreción tipo III LEE [<i>Escherichia coli</i>]
zzzz.12110	615	100%	0.0	100%	Sistema de secreción tipo III LEE translocon subunidad formadora de poros EspB [<i>Escherichia coli</i>]
zzzz.12113	696	100%	0.0	100%	Sistema de secreción tipo III LEE gatekeeper SepL [<i>Escherichia coli</i>]
zzzz.12115	319	100%	4,00E-110	100%	MULTISPECIES: sistema de secreción tipo III LEE chaperona CesT [Enterobacteriaceae]
zzzz.12116	258	100%	3,00E-087	100%	Sistema de secreción tipo III LEE chaperona CesF [<i>Escherichia coli</i>]
zzzz.12118	246	100%	2,00E-082	100%	Sistema de secreción tipo III Regulador positivo de actividad LEE ATPasa EscO [<i>Escherichia coli</i>]
zzzz.12119	188	100%	4,00E-060	100%	MULTISPECIES: sistema de secreción tipo III LEE efector citoprotector EspZ [Enterobacteriaceae]
zzzz.12120	190	100%	7e-61	100%	Proteína SepZ [<i>Escherichia coli</i>]
zzzz.12121	186	100%	1,00E-059	100%	Proteína de sistema de secreción tipo III SepZ [<i>Escherichia coli</i>]
zzzz.12125	314	100%	2,00E-108	100%	MULTISPECIES: sistema de secreción tipo III LEE chaperona CesD [Enterobacteriaceae]
zzzz.12126	280	100%	3,00E-095	100%	Sistema de secreción tipo III LEE regulador transcripcional GrlA [<i>Escherichia coli</i>]
zzzz.12158	1136	100%	0.0	100%	Receptor de intimina translocado Tir sistema de secreción tipo III LEE [<i>Escherichia coli</i>]
zzzz.12159	1108	100%	0.0	100%	Receptor de intimina translocado Tir sistema de secreción tipo III LEE [<i>Escherichia coli</i>]
zzzz.12160	1079	100%	0.0	100%	Receptor de intimina translocado Tir sistema de secreción tipo III LEE [<i>Escherichia coli</i>]
zzzz.12161	283	100%	2,00E-096	99%	MULTISPECIES: sistema de secreción tipo III LEE regulador de longitud de aguja EscP [Enterobacteriaceae]
zzzz.12163	349	100%	1,00E-121	100%	MULTISPECIES: proteína inhibidora de la nucleasa del huésped Gam [Enterobacteriaceae]

zzzz.12237	149	100%	2,00E-045	100%	Proteína hipotética C6981_12205 [<i>Escherichia coli</i>]
zzzz.12242	104	100%	3,00E-028	100%	Proteína hipotética [<i>Escherichia coli</i>]
zzzz.3397	236	100%	2,00E-77	100%	Proteína que contiene el dominio DUF1076 [<i>Escherichia coli</i>]
zzzz.3398	388	100%	2,00E-136	100%	Proteína que contiene el dominio DUF1076 [<i>Escherichia coli</i>]
zzzz.3399	288	100%	2,00E-97	100%	Efecto T3SS NleG [<i>Escherichia coli</i>]
zzzz.3404	441	100%	2,00E-156	100%	T3SS efector E3 ubiquitina-proteína ligasa NleG [<i>Escherichia coli</i>]
zzzz.3405	449	1	0%	100%	MULTISPECIES: proteína que contiene el dominio DUF1076 [<i>Escherichia</i>]
zzzz.3406	427	100%	2,00E-151	100%	Proteína que contiene el dominio DUF1076 [<i>Escherichia coli</i>]
zzzz.9099	394	100%	5,00E-139	100%	Proteína Gp2 de tipo inovirus [<i>Escherichia coli</i>]
zzzz.9837	407	100%	2,00E-143	100%	Chaperona regulada por bfpT [<i>Escherichia coli</i>]
zzzz.9838	205	100%	6,00E-67	100%	Regulador transcripcional de la familia PbsX [<i>Escherichia coli</i>]

*Puntaje total asignado del resultado del blast. **Cobertura de la secuencia utilizada como punto de partida para la búsqueda (*query*).

***Valor E (estadístico que indica la probabilidad de que la similitud encontrada se deba al azar). Código de colores: i) **Azul**, genes no considerados como marcadores, aparecen en otras especies con alta identidad (> 65%), ii) **Violeta**, genes considerados como marcadores (que requieren diseño de primers específicos para la especie), presentan una identidad >80% con los genomas de *E. coli* reportados y baja o nula identidad con otras especies (<65%), iii) **Verde**, genes considerados como buenos marcadores (que no requieren diseño de primers específicos para la especie), aparecen solo en *E. coli* y con identidad mayor al 80% (verdes), (secuencias conservadas), iv) **Amarillos**, posibles marcadores, aparecen solo en *E. coli* pero con ID menor al 80 (secuencias variables) (no se encontró ninguno de este categoría), v) **Grisés**, posibles marcadores, aparecen en *E. coli* y en *E. albertii* con alta id mayor al 80%.

El gen que nombramos como zzzz.10095, codifica una subunidad de un transportador de la toxina alfa-hemolisina (HlyA), relacionado clásicamente con la patogenicidad de las cepas de *E. coli* UPEC (uropatógenos) (HlyA es una proteína secretada, que se encuentra en una isla genómica y es producida por muchos tipos de *E. coli*). HlyA junto al factor necrotizante citotóxico 1 (CNF-1), pueden alterar las cascadas de señalización de las células huésped, alterando la respuesta inflamatoria e induciendo la muerte celular. Cuando la toxina se encuentra en altos niveles produciría lisis osmótica, mientras que a concentraciones sub-líticas podría modular las rutas de supervivencia de la célula huésped. HlyA es una toxina capaz de estimular la ruptura de la barrera epitelial y es por tanto responsable en parte de la

traslocación de la bacteria desde el tracto digestivo al torrente sanguíneo, donde finalmente se disemina y es capaz de colonizar diferentes tejidos, causando así la patología (Bakás *et al.*, 2013; Dhakal y Mulvey, 2012). HlyA es uno de los cuatro tipos de hemolisina identificados en *E. coli*, junto a enterohemolisina transportada por plásmidos y fagos (*ehxA*, *e-hlyA*) y hemolisina silenciosa (*sheA*). Los genes *ehxA* y *hlyA* pertenecen a la familia RTX (repetición en la toxina), que están muy extendidos entre los patógenos Gram negativos y los eritrocitos lisos de diferentes especies de mamíferos. El gen *ehxA*, localizado en el gran plásmido de virulencia enterohemorrágica de *E. coli* (pO157), se asocia frecuentemente con enfermedad diarreaica y SUH. La enterohemolisina asociada a bacteriófagos (*e-hlyA*) causa la liberación de la hemolisina silenciosa por lisis de las células bacterianas. La hemolisina silenciosa (*sheA*), también llamada citolisina A, codifica una toxina formadora de poros (Lorenz *et al.*, 2013). El inconveniente es que este marcador indicaría UPEC “puras” y cepas heteropatógenas de *E. coli* (en este caso ExPEC-STEC, como la cepa local O157:H7 recuperada de un caso de ITU; ver tabla 6 cepa N°24).

También encontramos genes como el *zzzz.10586*, que *a priori*, no estarían relacionados directamente a mecanismos de patogenicidad. El gen *zzzz.10586* codifica para una proteína del sistema de transferencia conjugativa tipo F. El plásmido F, es un ejemplo de plásmido conjugativo que tiene la capacidad de interactuar con el cromosoma bacteriano para integrarse en él. Recordemos que la conjugación bacteriana es un proceso de transferencia de información genética desde una célula donadora a otra receptora. En este tipo de procesos se transfiere información como por ejemplo genes de resistencia a antibióticos (Nagachinta y Chen, 2009; Nagachinta y Chen, 2008).

También encontramos genes que codifican proteínas relacionadas a fagos. Ejemplos son los genes zzzz.10691 y zzzz.11713. El primero corresponde a una proteína de transferencia de ADN de fagos y la segunda es una proteasa de la proa del fago HK97, en ambos casos los genes estarían relacionados a las cepas STEC del grupo 1, pero no está claro si existe una relación con la patogenicidad de las mismas o son genes ligados físicamente a los *stx* y *eae* sin estar relacionados en su función de forma directa. Lo que sí es conocido es que una parte importante del cromosoma de *E. coli* corresponde a bacteriófagos, de acuerdo a la información obtenida a partir de los miles de genomas de *E. coli* que se encuentran secuenciados. Los bacteriófagos son un importante mecanismo en la evolución de *E. coli* responsables de la transferencia horizontal de genes, incluidos genes relacionados con virulencia, encontrándose dentro de ellos los genes *stx*, insertos en el genoma de bacteriófagos atemperados del tipo lambdaoide (fagos Stx) que lisogenizan las cepas de STEC (Muniesa *et al.*, 2013; Imamovic *et al.*, 2010a; Imamovic *et al.*, 2009). En la literatura se encuentran numerosos reportes relacionados al estudio de fagos Stx. Se ha demostrado que los mismos se encuentran presentes en el medio extraintestinal, tanto en forma de partículas víricas libres como dentro de un grupo de cepas productoras de Stx, quienes bajo ciertas condiciones, pueden infectar e integrarse en cepas no productoras de Stx, convirtiéndolas en cepas productoras de toxina (Muniesa *et al.*, 2011; Imamovic and Muniesa, 2011; Imamovic *et al.*, 2010a; Imamovic *et al.*, 2010b; Muniesa *et al.*, 2006). Confirma esta afirmación la detección de fagos Stx infecciosos en alimentos aptos para el consumo, donde se ha demostrado que la transducción del gen *stx* a cepas no patógenas puede suceder en matrices alimentarias (Imamovic and Muniesa, 2011; Imamovic *et al.* 2009).

Otro gen relacionado a virus que encontramos es el zzzz.9099, que codifica para una proteína GP2 del tipo *inovirus*. Esta proteína está involucrada en la replicación del ADN viral. Se une al origen de la replicación y escinde el ADN doble cadena intermedio, permitiendo que comience la replicación. Está también involucrada en la generación de una nueva molécula circular de cadena única lista para ser empaquetada en un virión, luego del ciclo de replicación (Murphy, *et al.*, 1995).

Otro candidato asociado a STEC grupo 1 es el gen zzzz.11331 que codifica para una proteína de unión al ADN de la familia Arc (*Anoxic Redox Control*). Esta proteína forma parte de la gran familia del sistema de dos componentes (SCD) de los organismos procariontes. Este tipo de sistemas le confieren a la bacteria la capacidad de responder a variaciones en las condiciones del medio ambiente, lo cual le permite su supervivencia y crecimiento. Estos circuitos moleculares, que permiten integrar señales del medio exterior y dar respuestas, están conformados por una proteína censora que es una cinasa (CS) y una reguladora de la respuesta (RR). Es así que los sistemas de dos componentes regulan diversos procesos celulares como metabolismo energético, motilidad, formación de biopelículas, *quorum sensing*, reconocimiento de hospederos, respuesta a estrés o virulencia. Un ejemplo en *Escherichia coli* es el sistema ArcB/A. *E. coli* cuenta con una estructura formada por cuatro CS híbridas, BarA, EvgS, TorS y ArcB. El sistema ArcB/ArcA de *E. coli* regula la expresión de más de 300 operones, principalmente relacionados al metabolismo energético, acorde a las condiciones redox del medio (Nuñez-Oreza *et al.*, 2014).

El gen zzzz.12163 codifica para una proteína inhibidora de la exonucleasa bacteriana (GAM). Dicha proteína protege el ADN fágico de la degradación. La acción de la exonucleasa bacteriana permite que se lleve a cabo el ciclo lítico viral, y es cuando ocurre la mayor

liberación de las toxinas Stx, determinando una diseminación masiva en el sujeto infectado provocando daño endotelial extenso. Esta proteína podría además contribuir a la evolución bacteriana por medio de la adquisición de factores de virulencia por transferencia de ADN de fagos, a la diseminación de estos fagos y al aumento de la producción de STX cuando se dan determinadas condiciones (Sanchez y Guerrero, 1982). Futuros ensayos deberían evaluar la posibilidad de que este sea un blanco útil para evitar la progresión a SUH, ya que su actuación es imprescindible para completar el ciclo lítico y porque permite la reproducción vírica. El gen está presente en los fagos Stx1 y 2, y en fagos de *Salmonella*, entre otros, por esto no sirve para el diagnóstico (azul), pero parece tener interés biológico, y ser candidato a un blanco para drogas que bloqueen el comienzo del ciclo lítico y la expresión masiva de Stx. El objetivo sería usar el producto GAM o tratar con inhibidores de la nucleasa bacteriana (similares a GAM) para que la bacteria no entre en ciclo lítico (kuzminov A., 1999).

Los genes candidatos zzzz.3399 y zzzz.3404, por su parte, codifican para un efector del sistema de secreción de tipo III, el NLeG que codifica para E3, una proteína ligasa de ubiquitina. La ubiquitinación es un importante proceso eucariota en el cual se une de forma covalente la ubiquitina a los residuos de lisina de una proteína diana (Passmore & Barford, 2004). El objetivo de este proceso es marcar a las proteínas para la degradación por el proteosoma del huésped o regular su función (Passmore & Barford, 2004). El proceso se da en tres etapas: en primer lugar, se activa la ubiquitina (por la enzima E1); posteriormente la ubiquitina activada es transferida a una enzima conjugante (E2) y por último la enzima E3 (ubiquitin ligasa), cataliza la unión covalente mencionada anteriormente (Passmore & Barford, 2004). Por este motivo las enzimas E3 son las responsables de interactuar con los sustratos específicos y producir su ubiquitinación. Esta clase de enzimas se dividen principalmente en tres grandes

grupos de acuerdo al dominio de ubiquitinación que presentan, pero todos comparten el hecho de ser altamente conservados en los eucariontes (Zamudio *et al.*, 2012). Este proceso es un objetivo para algunos patógenos bacterianos que buscan manipularlo (Dean, 2011). Si bien inicialmente se creía que el mismo era exclusivo de eucariotas, se ha descubierto que algunas bacterias patógenas secretan proteínas efectoras durante la infección, similares en secuencia aminoacídica o estructural a las E3. Al parecer estas bacterias han adquirido estos genes por transferencia horizontal a partir del huésped. Las E3 bacterianas ubiquitinan proteínas del huésped de vías de señalización, como las cinasas involucradas en la respuesta inmune. De esta manera, simulan el sistema de ubiquitinación del huésped y logran marcar para degradación proteínas del sistema de defensa del mismo, logrando de esta manera evadirlo, y tener éxito en la infección (Zamudio *et al.*, 2012; Hicks *et al.*, 2010). En la mayoría de los casos, la poliubiquitinación dirige las proteínas al proteosoma para su degradación, mientras que la monoubiquitinación puede modular la función de la proteína, como se demostró para el efector SopB (Knodler *et al.*, 2009). Por tanto, futuros ensayos deberían evaluar la posibilidad de que este sea un blanco para drogas que bloqueen su acción, y de esta forma interferir en la evasión por parte de la bacteria de la respuesta inmune del huésped.

El gen zzzz.9837, por su parte, codifica para una chaperona regulada por BfpT (PerA). Ya se han reportado este tipo de chaperonas asociadas a EPEC típicas. Este es el caso de TrcA que estaría implicada en la formación de microcolonias de EPEC. Al parecer esta proteína interacciona con la intimina en el citoplasma (Tobe *et al.*, 1999). El BfpT es un regulador positivo de la expresión, por ejemplo, del operón *bfp* de *Escherichia coli* enteropatógena clásica (EPEC) (Clarke *et al.*, 2003). Bfp es codificado en el plásmido pEAF y pertenece a la

Familia AraC de activadores transcripcionales y se requiere para la autoactivación del operón per. Esto llevaría a pensar que las cepas STEC (grupos 1 y 2) también cuentan con este sistema de regulación, lo que ya fue observado en la cepa híbrida O104:H4 que causó el brote de Alemania en el año 2011. Se sabe que esta cepa cuenta con un regulador de la familia AraC, que tiene una homología del 28% con BfpT de EPEC típica, y que tiene una participación directa en la adhesión bacteriana para lograr la infección (Lang *et al.*, 2018).

Por último, el gen zzzz.9838 que codifica para un regulador transcripcional de la familia PbsX. PbsX son proteínas codificadas en un profago de *Bacillus subtilis*. Este es otro ejemplo de genes que originalmente se encontraban en otras especies bacterianas y que al día de hoy presentan como homólogos en *E. coli*.

Futuros ensayos podrían evaluar cuales genes no están presentes en los genomas de las cepas de los grupos 1 y 2 para definir otros "sitios calientes" (como por ej. donde se ubican LEE, fagos temperados) que le permitan a una cepa armarse con los genes de virulencia o resistencia. Asimismo, evaluar aspectos reportados por otros autores que afirman que las cepas no-O157 aceptan más genes y que los aislamientos de casos clínicos severos (EHEC) tienen más genes de ARNt en su genoma, tal como fue reportado por el grupo de Ogura *et al.*, en el 2009. Los autores realizaron un estudio de genómica comparativa de un grupo de *E. coli* productor de toxina Shiga (STEC) y llegan a la conclusión de que este grupo de cepas estudiadas posee más genes para ARNt que otras cepas de *E. coli* y *Shigella*. Además, demostraron que los genes de ARNt son a menudo el objetivo de las inserciones de ADN, para dos o tres elementos genéticos a la vez. Ensayos posteriores del grupo de Salie *et al.*, del 2018 llegaron a conclusiones similares estudiando los sitios de inserción *pheU*, *pheV* y *selC*.

Marcadores Moleculares para diagnóstico

De estas 40 secuencias, 12 cumplen los criterios para ser consideradas marcadores moleculares para diagnóstico de STEC *eae+* (grupo 1) (tabla 20). Según los resultados de la búsqueda en la base de datos GenBank, dos de ellas corresponden a proteínas que solo se identifican con *E. coli* con alta identidad y cobertura (verdes). Ambas secuencias no tienen función asignada, también llamadas proteínas hipotéticas. Es interesante observar que en algunos casos estas secuencias aparecen en directo y en otros casos anotadas como reverso complementario. Sería interesante a futuro ver donde se ubican estos genes hipotéticos, por ejemplo, analizar si están ligados físicamente a otros genes identificados. El gen zzzz.12242, por su parte, tiene una región similar a un efector del sistema de secreción tipo III. 7 genes están clasificados como “violetas”, es decir son exclusivos de *E. coli* cuando se establecen valores de identidad específicos. Estos genes son potenciales marcadores siempre y cuando se realice un diseño de *primers* de modo de amplificar una zona exclusiva de *E. coli*. Estos genes corresponden a un homólogo de *espO*, dos codifican NleG ligasas de ubiquitina, dos codifican proteínas desconocidas que contienen el dominio DUF1076, también aparece una proteína desconocida codificada en un profago y un regulador transcripcional de la familia PbsX. Los tres genes que aparecen en gris, presentan alta homología con *Escherichia albertii*. Esta bacteria, recientemente reconocida, está relacionada filogenéticamente con *Escherichia coli*, y es un enteropatógeno humano y patógeno aviar emergente. Es difícil de discriminar de otras especies de *Enterobacteriaceae* por lo cual es corrientemente confundido con EPEC ya que utiliza el sistema de secreción tipo 3 e intimina (Yamamoto *et al.*, 2017). Estos marcadores (grises) se deberían por tanto utilizar en diagnóstico en conjunto con otros específicos de STEC.

Cabe señalar que los valores de corte para definir homología dependen de la familia génica que se trate. Un 80% de identidad a nivel aminoacídico (amarillos), podría llegar a ser de 2/3 de identidad a nivel nucleotídico, por lo cual un 53% de identidad a nivel nucleotídico permite un diseño de primers. En el caso de los violetas si aparece con 65% de identidad tengo un 35% para hacer diseño de primers (25% identidad a nivel nucleotídico).

Tabla 20. Genes candidatos a marcadores moleculares para diagnóstico de STEC que pasaron la validación.

Código del Gen	Total Score **	Query cover***	E value****	Identidad	Predicción funcional en base a homología
zzzz.10990	191	100	2,00E-61	100%	Homólogo a EspO, efector secretado por T3SS (<i>E. coli</i>)
zzzz.11138	107	100%	2,00E-29	100%	Proteína hipotética D4M50_02660 [<i>Escherichia coli</i>]
zzzz.11330	165	100%	2,00E-51	100%	Proteína desconocida codificada dentro del profago CP-9330 [<i>Escherichia coli</i> O157: H7 str. EDL933]
zzzz.12158	1136	100%	0.0	100%	Receptor de intimina translocado Tir sistema de secreción tipo III LEE [<i>Escherichia coli</i>]
zzzz.12242	104	100%	3,00E-028	100%	Proteína hipotética [<i>Escherichia coli</i>]
zzzz.3397	236	100%	2,00E-77	100%	Proteína que contiene el dominio DUF1076 [<i>Escherichia coli</i>]
zzzz.3398	388	100%	2,00E-136	100%	Proteína que contiene el dominio DUF1076 [<i>Escherichia coli</i>]
zzzz.3399	288	100%	2,00E-97	100%	Efector T3SS NleG [<i>Escherichia coli</i>]
zzzz.3404	441	100%	2,00E-156	100%	T3SS efector proteína E3 ligasa de ubiquitina NleG [<i>Escherichia coli</i>]
zzzz.3406	427	100%	2,00E-151	100%	Proteína que contiene el dominio DUF1076 [<i>Escherichia coli</i>]
zzzz.9837	407	100%	2,00E-143	100%	Chaperona regulada por bfpT [<i>Escherichia coli</i>]
zzzz.9838	205	100%	6,00E-67	100%	Regulador transcripcional de la familia PbsX [<i>Escherichia coli</i>]

*Puntaje total asignado del resultado del blast. **Cobertura de la secuencia utilizada como punto de partida para la búsqueda (query).

***Valor E (estadístico que indica la probabilidad de que la similitud encontrada se deba al azar).

Cabe recordar que uno de los problemas en diagnóstico basado en amplificaciones de ADN es no poder asegurar que, en una muestra compleja, por ejemplo, alimentos, heces, etc, los genes *stx* y *eae* se encuentren en la misma cepa (mismo genoma). Los marcadores que hemos determinado permitirían solucionar este problema con un 95% de confianza para las cepas del grupo 1 (STEC patógenos definidos, que contiene conjuntamente los genes *stx* y *eae*), si

se trabaja de forma individual. Son necesarios ensayos complementarios y robustos para evaluar si las combinaciones de marcadores identificados aquí aumentan la potencia de los ensayos AAN en la identificación de cepas “STEC patógenos clásicos” (grupo 1) en este tipo de muestras. Asimismo, se debería realizar el diseño de cebadores específicos para *E. coli*, para los genes que pasaron la validación y a su vez son candidatos como buenos marcadores moleculares.

CAPÍTULO 5

CAPÍTULO 5. Secuenciación genómica completa de 10 cepas locales, búsqueda de genes candidatos a marcadores moleculares y genes de resistencia a antibióticos

En el presente capítulo se presentan, los pasos dados para obtener los genomas completos y ensamblados, de tres aislamientos O157 de interés (dos de los cuales son O157:H7), caracterizados como pertenecientes al clado 8, que se enviaron para su secuenciación al Laboratorio de Referencia de STEC de Comunidad Europea, y de siete aislamientos de origen clínico (serogrupos O157:H7, O145, O26, O26:H11, O153:HNT, O111) que fueron enviados a secuenciar a MacroGen en Corea. Estos pasos implican la extracción de ADN, secuenciación y el ensamblado de los genomas. El objetivo de este capítulo fue buscar en estos genomas, la presencia de los genes candidatos identificados del capítulo anterior a los efectos de evaluar su presencia en cepas locales, realizar el MLST que se presentó en el capítulo 1 y buscar en dichos genomas la presencia de genes relacionados a resistencia a antibióticos que fueron presentados en el capítulo 3.

Metodología

Secuenciación genómica completa de un conjunto seleccionado de cepas

ADN para secuenciación

Para realizar la extracción de ADN se utilizó el *kit* DNeasy Blood and Tissue (Qiagen). A partir de una colonia pura se inoculó un tubo con 3.0 mL de TSB y se incubó a 37°C *overnight* (18-20 hs), pasado este tiempo se transfirió 1.0 mL del cultivo fresco, a un tubo de 1.5 mL y se centrifugó 5 min a 5.000 g. Se descartó el sobrenadante y se siguieron las instrucciones del

fabricante modificando solo la elución final, ya que se utilizó el buffer de elución del *kit*, pero en una dilución 1/5 en agua ultrapura grado PCR.

Luego de realizada la extracción, el ADN fue cuantificado y caracterizado en un Nanodrop, considerando aceptable las muestras que presentaron una relación de A 260/280 entre 1.8 y 2.2 y una relación de A 260/230 menor a 1.5. Posteriormente, las muestras fueron cuantificadas por electroforesis usando geles de agarosa al 0.7%. Se utilizó como marcador lambda (350 ng/ μ L) a concentraciones adecuadas. Las muestras fueron mantenidas a 4°C hasta su envío para secuenciación.

Secuenciación genómica

Se realizó una secuenciación *Shotgun* de Illumina (Illumina platform, *paired-end*), en el caso de los genomas enviados a Corea, útil para la secuenciación de genomas microbianos completos (Illumina, 2010; Illumina, 2015) y se secuenciaron por Iron Torrent los genomas enviados a Italia.

Análisis de calidad de las secuencias y mejoramiento de las mismas

A partir de los *reads* obtenidos de la secuenciación de cada cepa en formato fastq, se procedió a eliminar la contaminación con adaptadores, utilizando el programa SCYTHE (version 0.994 BETA) (disponible en <https://github.com/vsbuffalo/scythe>) y a realizar un análisis de calidad de estas secuencias con el programa FastQC (versión Version 0.11.7) (disponible en <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>).

El análisis de calidad del ensamblado se basó en i) la cobertura o profundidad del secuenciado ii) la calidad de la secuencia medida como *Phred score* por base iii) la calidad promedio de la secuencia y iv) la distribución del largo de las secuencias.

En base al análisis anterior se decidió si era necesario realizar un recorte en base a calidad (o *quality trimming*) a los efectos de eliminar las regiones de baja calidad de las secuencias generadas. El recorte en base a calidad y largo se realizó con el programa SICKLE (Joshi, 2011). Se utilizaron los valores de corte por defecto del programa. Posteriormente se volvió a realizar un FastQC.

Ensamblado de genomas

El ensamblado de *novo* de los genomas se realizó utilizando el programa SPADES versión 3.14.1 (Nurk, Bankevich, *et al.*, 2013). El SPADES es un ensamblador que se basa en gráficos de Brujin. Es decir, se basa en encontrar el camino euleriano en un grafo de Brujin construido con K-mers solapantes obtenidos de las secuencias de los *reads*. Se realizó la corrección de lecturas en base a la información de los *paired-ends* que proporciona el SPADES. La calidad del ensamblaje fue evaluada con el script abyss-fac.pl, escrito en lenguaje de programación Perl que forma parte del paquete Abyss (ABYSS 2.0) (Jackman *et al.*, 2017). Se analizó el estadístico de continuidad N50, el máximo contig ensamblado, el total de contigs y el tamaño total del ensamblaje, entre otros elementos de continuidad.

Búsqueda de genes candidatos en aislamientos locales

Con el objetivo de buscar la presencia de los genes candidatos en los aislamientos locales, se realizó un *tblastn* (Altschul *et al.*, 1990). Se definió la presencia de los genes candidatos en un rango de identidad entre el 50 % y el 95 % y con un 80 % de cobertura. Luego se construyeron tablas de genomas y genes para cada valor de identidad, y se evaluó en cada genoma la presencia o ausencia del gen de interés.

Resultados y Discusión

Estadísticos del ensamblaje

En la tabla 21 se presentan los estadísticos del ensamblaje de los genomas secuenciados. Como puede observarse los tamaños de los genomas son los esperados para *E. coli*, el número de contigs ronda los 500 lo que se encuentra sobre la media de los genomas publicados en *Enterobase* a 2017, como puede observarse en la gráfica 15a; lo mismo sucede con el N50 (ver gráfica 15b) (<https://enterobase.warwick.ac.uk/>). El contenido de GC del 50 % resultó ser el esperado (Souza *et al.*, 2001). Según estos resultados la calidad de estas secuenciaciones no es la óptima, ya que se precisan más fragmentos para reconstruir el genoma, lo cual puede conducir a la ocurrencia de ausencia de genes como artefacto del ensamblado.

Tabla 21. Estadísticos del ensamblaje de los genomas locales secuenciados y ensamblados.

Estadísticos de ensamblado										
Código de aislamiento	2	4	29	24	50	52	54	60	61	69
Serogrupo/serotipo	O157:H7	O157:H7	O157	O157:H7	O145	O145	O26	O26:H11	O153:HNT	O111
Origen	Alimentos	Alimentos	Alimentos	Humano (URO)	Humano (SUH)	Humano (SUH)	Humano (SUH)	Humano (diarrea con sangre)	Humano (diarrea con sangre)	Humano (SUH)
Longitud del genoma (sum)	5.463.213	5.447.569	5.465.895	5.417.180	5.375.933	5.347.381	5.696.622	5.725.358	5.166.574	5.560.796
No. Contigs (n)	525	516	443	465	500	465	600	588	526	562
Contig más pequeño	137	137	129	128	128	128	128	128	128	128
Contig más largo (Max)	375.651	369.764	375.780	375.166	387.431	387.430	321.324	334.555	287.554	374.261
Longitud media contig	10.406	10.557	12.338	11.649	10.751	11.499	9.494	9.737	9.822	9.894
N50	125.767	121.913	146.635	190.189	185.284	185.284	118.063	118.061	106.846	99.677
N20	257.138	259.073	302.752	273.057	312.626	312.584	204.767	204.991	183.877	374.261
N80	43.465	43.483	44.734	84.577	86.658	86.658	49.910	48.450	43.191	42.262
N:200	510	502	427	411	411	389	516	504	447	477
L50	12	13	12	10	10	10	16	16	15	15
No ATCG	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Contenido de GC	50,2%	50,3%	50,3%	50,4%	50,4%	50,4%	50,4%	50,4%	50,6%	50,4%

Búsqueda de genes candidatos en aislamientos locales

Al realizar la búsqueda de los 40 genes candidatos que pasaron la validación en los 10 genomas de cepas STEC locales, se pudo observar que 37 de estos genes aparecen en los 10 genomas, con los mismos rangos de identidad en lo que fueron definidos como marcadores. Dentro de los 37 genes se encuentran los zzzz.12163, zzzz.3399 y zzzz.3404, que al parecer presentan un enorme interés biológico porque podrían servir como blanco para drogas de uso en el tratamiento o prevención de los casos de SUH. Por otra parte, el gen zzzz.11138 aparece en los 10 genomas, pero en uno de ellos con 97% de Id y 75% de cobertura. El gen zzzz.11330 que validó a un 50% de id, no aparece en los genomas *E. coli* 50 y *E. coli* 52, ambas del serogrupo O145, obtenidas de SUH en los años 2013 y 2017 (tabla 6). Estas cepas se asociaron en el mismo pulsogrupo de PFGE y presentaron el mismo perfil de MLST (ST 342, esquema Atchman). El gen zzzz.11331 no aparece en el genoma de *E. coli* 61 (O153 obtenida de caso clínico), y aparece en un rango de identidad entre el 37 y el 57% y cobertura entre 46 y 98%. Una de las posibles causas de no haber encontrado estos tres genes en todos los genomas de cepas locales puede deberse a un artefacto en el ensamblaje o en la secuenciación, o al hecho de que los genomas no están cerrados. También puede deberse a la variabilidad que se manejó en el diseño cuando se estableció la definición de los marcadores (presencia en el 95% de “STEC patógenos definidos clásicos” y hasta 5% en “Otros *E. coli*” no patógenos para STEC) (grupo 5), por lo cual, los genomas patógenos pueden no validar el 100% de los marcadores. Como se mencionó anteriormente la combinación de marcadores para su uso en diagnóstico debería ser evaluada en términos estadísticos. Otro aspecto a tener en cuenta es la gran diversidad y plasticidad genómica reportada para *E. coli*. Un trabajo reciente de revisión (Denamur *et al.*, 2020) concluye que debido a la estructura genética de la población y la ecología de *E. coli*, aparecen nuevos clones patógenos de forma

constante y que esto es imposible de predecir, ya que se encuentran muchas combinaciones de genes relacionados con la virulencia, lo cual refleja una epistasis intergénica compleja. Destacan la importancia que ha tenido y seguirá teniendo la secuenciación de genomas completos (WGS, por sus siglas en inglés) en la clasificación de las cepas patógenas y en la actualización constante de dicha clasificación en el contexto de la genética de poblaciones. También en la descripción de la historia filogenética de las cepas basada en el genoma conservado en asociación con el genoma variable. Asimismo, Touchon *et al.* (2020), que presentan un extenso trabajo realizado a partir de cepas de *E. coli* obtenidas de diferentes ambientes, concluyen que la gran diversidad genética es debida a elementos genéticos móviles, y que el análisis de cepas de los mismos secuenciotipos muestra rápidos cambios en el repertorio de genes en las primeras etapas de divergencia. Estos elementos también conducirían a una rápida variación en el tamaño del genoma, lo cual estaría asociado al filogruppo y las fuentes de aislamiento, lo que sugiere que el flujo de genes refuerza la asociación de ciertos antecedentes genéticos con hábitats específicos. Los autores afirman que la divergencia del repertorio de genes se vuelve lineal con la distancia filogenética, lo cual refleja la rotación continua del elemento móvil y la adquisición ocasional de genes adaptativos.

Los resultados obtenidos en relación a la presencia de los genes candidatos a marcadores moleculares tanto para comprender la biología de las STEC, como los que fueron propuestos para el diagnóstico, o posibles blancos para drogas, son alentadores.

Futuros ensayos podrían evaluar en estos genomas locales la ubicación de los promotores relacionados a los genes marcadores moleculares que hemos definido así como evaluar su expresión en diferentes condiciones.

CONCLUSIONES

Conclusiones

El serotipo más frecuente estudiado en las cepas provenientes de alimentos en este conjunto de cepas, correspondió a O157:H7, seguido por el serotipo O26. no siendo este el serotipo mayormente recuperado en los aislamientos de origen clínico como responsable de SUH. Esto puede deberse al sesgo de los datos, ya que hasta hace unos años solo se buscaba O157 en alimentos, y los aislamientos analizados aquí provienen principalmente de carne estudiada en ese período. Un estudio previo en Uruguay encontró que el ganado uruguayo sería un importante reservorio de serotipos claramente asociados con enfermedad humana grave como O26, O103: H22, O111: NM y O113: H21 (Balseiro *et al.*, 2012). También podría pensarse en otras vías de transmisión, como ser el contacto entre personas, el contacto con animales contaminados, u otros tipos de alimentos. Resultados similares fueron recientemente reportados en Argentina donde el consumo de carne de res solo explicaría el 10% de los casos de SUH (Brusa *et al.*, 2020). Asimismo, se podría plantear la necesidad de mejorar las técnicas de detección de otros serotipos en los reservorios potenciales y en los alimentos. También surge la hipótesis de si en nuestro país, las cepas con mejores características virulentas son las que producen enfermedad en humanos y no las más prevalentes en los reservorios estudiados.

Con respecto a los serogrupos/serotipos presentes en los casos clínicos estudiados en esta tesis correspondieron a: O157:H7 (uno de un caso de ITU), O145 (dos de dos casos de SUH), O26 (uno de un caso de SUH), O26:H11 (uno de un niño con diarrea sangrinolienta), O153:HNT (uno de un niño con diarrea) y O111 (uno de un niño con SUH). Los cuatro aislamientos obtenidos de ganado, dos correspondieron a O157 y dos a O26.

La asociación de dos de los aislamientos O157 al clado 8, en un *cluster* diferente a las demás cepas, apoya la hipótesis de Manning (Manning *et al.*, 2008) que sostiene que el mismo es un clado emergente con características a nivel genético diferentes a los demás clados, lo cual podría estar relacionado al hecho de que se presentan como cepas con alta asociación a enfermedad severa en humanos. Sin dejar de tener en cuenta que el proceso *E. coli*---STEC o EHEC---es una construcción colectiva en la que contribuyen entre otros, bacterias, fagos, etc., aportando material genético.

Los resultados del MLST y de la PFGE son concordantes y apoyan la idea de clonas STEC patogénicas circulantes que aparecen tanto en ganado, como en los alimentos y en los casos clínicos y persisten a lo largo de los años. Los ST 11, 21 y 16 que aparecen en las cepas obtenidas de casos clínicos, han sido frecuentemente asociados a casos de enfermedad severa en seres humanos.

En relación a la distribución de los genes *stx* para los aislamientos O157 y no-O157, *stx2* sería el de mayor prevalencia en los aislamientos O157, presentándose una prevalencia similar entre *stx1* y *stx2* en los aislamientos no-O157. Si llevamos los resultados al total de aislamientos estudiados, si bien ambos genes se presentan con una elevada prevalencia, el gen *stx2* productor de toxina Shiga es quien se presenta con mayor prevalencia en los aislamientos locales analizados. Para el caso de los aislamientos de origen humano ambos genes se presentan con una elevada prevalencia, en el caso de *stx2* la prevalencia es similar al conjunto total de aislamientos, pero presentan una prevalencia mayor del gen *stx1*. Por lo cual las cepas responsables de procesos infecciosos en seres humanos recuperadas en nuestro país, podrían ser portadoras de un mayor número de estos genes o factores de virulencia que las demás cepas recuperadas de alimentos, lo cual también apoyaría la

hipótesis de que cepas con mayores capacidades virulentas son las que producen procesos infecciosos en seres humanos.

Se han podido conocer las distribuciones de las variantes de los genes *stx1* y *stx2* productores de toxina Shiga. En el caso de *stx1* la variante a se presentó con mayor frecuencia tanto al analizar los aislamientos locales O157, los no-O157, así como el total de cepas, mientras que para los aislamientos humanos las variantes a y c presentaron la misma frecuencia. Con respecto al gen *stx2*, *stx2c* es la variante con mayor prevalencia a nivel local si el análisis se realiza con respecto a los aislamientos O157 y a los totales; en cambio si se analizan las cepas no-O157, así como los aislamientos de origen humano, la variante a es la que presenta mayor prevalencia. La combinación de las variantes a, c y d (la variante d debería ser confirmada por WGS) resultó ser la más frecuente tanto en los aislamientos O157 como en el total, mientras que la combinación a y c fue la más frecuente en las cepas no-O157. El haber encontrado la variante a en una elevada prevalencia (71%) de los aislamientos obtenidos a partir de casos clínicos, es concordante con lo reportado por otros autores previamente (Friedrich *et al.*, 2002; Beutín *et al.*, 2012; Oderiz, *et al.*, 2018). Según el último informe de la EFSA, *stx2a* mostró las tasas más altas de SUH, hospitalización y diarrea con sangre; sin embargo, todos los demás subtipos de *stx*, o combinaciones de los mismos, también se asociaron con enfermedades graves (EFSA, 2020).

Se determinó la distribución del gen *eae* que codifica para la proteína de membrana externa intimina, responsable de la adherencia estrecha de STEC con los enterocitos, y sus variantes $\gamma 1$ y $\beta 1$. El hecho de haberse detectado en el 94% de las cepas, apoya la idea de que es uno de los principales factores de virulencia tanto en cepas O157 como no-O157, y en los casos clínicos.

Con respecto a las variantes del gen *eae*, la variante Y1 resultó ser la única identificada en las cepas O157, mientras que para las cepas no-O157 solo se identificó la variante β 1. En los aislamientos de origen humano se encontraron ambas variantes, siendo la β 1 la más frecuente, este hecho está relacionado a los serotipos correspondientes a las cepas de este grupo.

En relación a la presencia de otros genes implicados en la virulencia, principalmente genes relacionados a la adherencia bacteriana a células eucariotas se analizó la presencia de los genes *tccP*, *espJ*, F9, *iha*, *lpf*, *hcpA*, *katP* y *espP*. Se evidenció una rica distribución de estos factores de virulencia adicionales. En todos los casos se presentaron con una mayor frecuencia en las cepas O157 que en las no-O157, y esto puede deberse en parte a los cebadores utilizados, ya que muchos de ellos fueron desarrollados para el serogrupo O157. Con respecto a los aislamientos de origen humano, también mostraron una rica distribución de los factores *lpf*, *iha*, *hcpA*, F9 y *espJ*, mientras que los genes *tccp*, *espP* y *katP* solo se determinaron en un aislamiento humano.

Al estudiar los clados a los que pertenecen las cepas locales O157:H7, solo tres cepas se identificaron como pertenecientes al clado 8, siendo este el clado que junto a los clados 2 y 3, se presentan con mayor asociación a casos de enfermedad en humanos (Manning *et al.*, 2008; FDA, 2007; CDC, 2006; CDC, 1993).

Cabe destacar que dos de las cepas que correspondieron a estos clados se asociaron en el mismo pulsogrupo en la PFGE (97% de identidad) por lo cual presentarían perfiles genéticos similares. La baja incidencia de estos clados hipervirulentos en nuestro país podría entonces ser uno de los factores que explicaría las diferencias en lo que respecta a la distribución de

serogrupos STEC asociados a casos de SUH entre Uruguay y Argentina donde el SUH es endémico (Mellor *et al.*, 2012).

En lo que respecta a los sitios de inserción de la Isla de Patogenicidad LEE (*pheU*, *selC* y *pheV*), muchos de los aislamientos presentaron más de un sitio ocupado. En estos casos se podría saber cuáles son los sitios ocupados, pero no se podría afirmar en cuál de estos sitios se encuentra la isla que codifica para *eae*.

La tasa de resistencia encontrada en STEC (10%) sugiere que su contribución local al problema de la resistencia a los antimicrobianos es similar a la observada en Argentina y menor que la reportada en Brasil. Sin embargo, algunos de los genes responsables, probablemente se encuentren ubicados en integrones de clase 1, pudiendo ser fácilmente transferibles a otras bacterias Gram-negativas intestinales. La carga de genes de resistencia encontrados, incluso en aislamientos susceptibles, sugiere que estos patógenos podrían tener un rol importante como reservorio de genes de resistencia transferibles.

Con respecto a los estudios bioinformáticos se han podido identificar 40 secuencias relacionadas a STEC que podrían servir para detectar la presencia de STEC *eae+*, comprender aspectos de la biología de las STEC, así como características de virulencia. Dentro de ellas se determinaron doce secuencias blanco que podrían ser utilizadas como marcadores moleculares para apoyar el diagnóstico de un grupo de estos patógenos y así aportar al control de su presencia tanto en alimentos como en muestras de seres humanos y animales. En algunos casos también como sitios potenciales para el diseño y evaluación de tratamientos fisiopatológicos de las infecciones por STEC.

Se han secuenciado y ensamblado 10 genomas de cepas STEC locales, con buena calidad de ensamblado, en los cuales se ha podido realizar el MLST, búsqueda de genes de resistencia a antibióticos y donde se encontraron las secuencias relacionadas a STEC determinadas previamente, y en los mismos rangos de identidad en que fueron validadas. Dentro de los 37 genes se encuentran los zzzz.12163, zzzz.3399 y zzzz.3404, que al parecer presentan un enorme interés biológico porque podrían servir como blanco para drogas. Los resultados obtenidos en relación a la presencia de los genes candidatos a marcadores moleculares tanto para comprender la biología de las STEC, como los que fueron propuestos para el diagnóstico, o posibles blancos para drogas, son alentadores a su uso.

Perspectivas

- Evaluar la variabilidad de genes *stx1*, *stx2* y *eae* en los diferentes serotipos y hacer estudios de filogenias, con el objetivo de avanzar en la comprensión de la biología de las STEC y su capacidad virulenta diferencial entre cepas.
- Recordar que hay cepas STEC *eae* negativas (sobretudo del grupo 2), donde resultaría interesante estudiar los sitios ocupados, cuáles están ocupados y con cuáles elementos, si los mismos están relacionados a patogenicidad o si por el contrario al ocupar el sitio bloquean el ingreso de genes de virulencia y disminuyen así las capacidades patogénicas de la cepa.
- Realizar estudios en diferentes ambientes y en los alimentos, en relación a los bacteriófagos circulantes en nuestro país.
- Continuar con WGS y búsqueda de los genes candidatos en cepas locales y/o regionales.
- Búsqueda de marcadores moleculares relacionados a *stx* y otro gen que no sea *eae* como *aggR*, con el objetivo de definir marcadores adicionales que permitan detectar de forma temprana y segura cepas STEC híbridas como la del brote de Alemania en 2014.
- Estudiar la distribución de serogrupos en los genomas de enterobase y definir marcadores relacionados a serogrupos.
- Evaluar la posibilidad de que el producto del gen zzzz.12163 que codifica para una proteína (GAM) inhibidora de la nucleasa bacteriana sea un blanco para evitar la progresión a SUH.

- Evaluar si la exonucleasa bacteriana está asociada a patogenicidad, para lo cual se debería estudiar la distribución y variabilidad de la misma.
- Evaluar la posibilidad de que los genes candidatos zzzz.3399 y zzzz.3404, que codifican para un efector del sistema de secreción de tipo III, el NLeG que codifica para E3, una proteína ligasa de ubiquitina, sean blancos para drogas que bloqueen su acción, y de esta forma interferir en la evasión por parte de la bacteria de la respuesta inmune del huésped.
- Estudiar en genomas de diferente secuenciotipo, la localización de los genes marcadores definidos, a los efectos de evaluar si los mismos se encuentran asociados a un fago o a una isla de patogenicidad. También se podrían analizar genes cercanos hacia sus costados (4 o 5) para observar el entorno genético y buscar promotores.
- Buscar en genomas locales la ubicación de los promotores relacionados a los genes marcadores moleculares que hemos definido.
- Buscar genes que no estén presentes en los genomas patógenos para STEC para definir "sitios calientes" que le permitan a una cepa armarse con los genes de virulencia o resistencia.
- Evaluar si las combinaciones de marcadores aumentan la potencia en la identificación de cepas STEC patógenas clásicos (grupo 1) en este tipo de muestras.
- Realizar el diseño de cebadores específicos para *E. coli*, para los genes que pasaron la validación y a su vez son candidatos como buenos marcadores moleculares.

Referencias

- AESAN. **2012**. Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) sobre medidas de prevención y recomendaciones aplicables para evitar posibles infecciones alimentarias por cepas de *Escherichia coli* verotoxigénicos/productores de toxinas Shiga/enterohemorrágicos (VTEC/STEC/EHEC). *Revista del Comité Científico*. Nº16, 71-101.
- Alcock, B., Raphenya, A., Lau, T., et al. **2020**. CARD 2020: antibiotic resistance surveillance with the Comprehensive Antibiotic Resistance Database. *Nucleic Acids Research*. 48: 517-525.
- Altschul, S., Gish, W., Miller, W., Myers, E., Lipman D. **1990**. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215:403–410.
- Amigo, N., Mercado, E., Bentancor, A., Pallavi, S., Vilte, D., Gerhardt, E.C., Zotta, E., Ibarra, C., Manning, Sh., Larzábal, M., Cataldi, A. **2015**. Clade 8 and Clade 6 Strains of *Escherichia coli* O157:H7 from Cattle in Argentina have Hypervirulent-Like Phenotypes. *PLoS ONE*. 10(6): e0127710.
- Assumpção, G., Cardozo, M., Beraldo, L., Maluta, R., Silva, J., Avila, F., McIntosh, D., Rigobelo, E. **2015**. Padrões de resistência antimicrobianos e da presença de *stx1*, *stx2* e “*ae*” em “*Escherichia coli*”. *Rev. Bras. Saúde Prod. Anim.* 16 (2): 308-316.
- Achtman M. **2008**. Evolution, population structure, and phylogeography of genetically monomorphic bacterial pathogens. *Annu Rev Microbiol.* 62:53–70.
- Bakás, L., Maté, S., Vazquez, R., Herlax, V. **2013**. Mecanismo de acción de la toxina alfa hemolisina de *Escherichia coli*. *Acta Bioquím Clín Latinoam.* 47 (2): 353-61.
- Balseiro, M., Gadea, M., Gonzalez, S., Gonzalez, G., Mota, M., Cattaneo, M., Chinen, I., Miliwebsky, E., Navarro, A., Varela, G., Rivas, M., Livrelli, V., Schelotto, F. **2012**. Characteristics of Shiga Toxin Producing *E. coli* (STEC) Non-O157 Strains Isolated from Ruminants Between 2003 and 2011 in Uruguay. *Zoonoses and Public Health*. 59 (Suppl. 1), 19–90.

Bentancor A. **2006**. El rol epidemiológico de las mascotas en el ciclo de transmisión urbana de cepas ST- EC. *Medicina* (Buenos Aires). 66 (Supl III): 37-41. ISSN 0025-7680.

Beutin, L., Geier, D., Steinruck, H., Zimmermann, S., Scheutz F. **1993**. Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-like toxin) –producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy domestic animals. *J Clin Microbiol*. 31: 2483-2488.

Beutin, L., Hammerl, J. A., Strauch, E., Reetz, J., Dieckmann, R., Kelner-Burgos, Martin, A., et. al. **2012**. Spread of a Distinct Stx2-Encoding Phage Prototype among *Escherichia coli* 104:H4 Strains from Outbreaks in Germany, Norway, and Georgia. *Journal of Virology*. 86(19): 10444–10455.

Bielaszewska, M., Friedrich, A., Aldick, T., Schürk-Bulgrin, R., Karch, H. **2006a**. Shiga toxin activatable by intestinal mucus in *Escherichia coli* isolated from humans: Predictor for a severe clinical outcome. *Clin. Infect. Dis*. 43: 1160–1167.

Bielaszewska, M., R. Prager, W. Zhang, A. W. Friedrich, A. Mellmann, H. Tschape, and H. Karch. **2006b**. Chromosomal dynamism in progeny of outbreak-related sorbitol-fermenting enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:NM. *Appl. Environ. Microbiol*. 72: 1900-1919.

Bielaszewska, M., Middendorf, B., Kšck, R., Friedrich, A., Fruth, A., Karch, H., Schmidt, M., Mellmann A. **2008**. Shiga toxin-negative attaching and effacing *Escherichia coli*: distinct clinical associations with bacterial phylogeny and virulence traits and inferred in-host pathogen evolution. *Clin. Infect. Dis*. 47:208–217.

Bielaszewska, M., Mellmann, A., Zhang, W., Köck, R., Fruth, A., Bauwens, A., Peters, G., Karch, H. **2011**. Characterization of the *Escherichia coli* strain associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, 2011: a microbiological study. *Lancet Infect Dis*. 11 :671-676.

Blanco, M., Schumacher, S., Tasara, T., Zweifel, C., Blanco, J.E., Dhahi, G., Blanco, J., Stephan, R. **2005**. Serotypes, intimin variants and other virulence factors of *eae* positive *Escherichia coli* strains isolated from healthy cattle in Switzerland. Identification of a new intimin variant gene (*eae-η2*). *BMC Microbiol*. 5: 23.

Blanco, M., Blanco, J., Dahbi, G., Mora, A., Alonso, M., Varela, G., Gadea, M., Schelotto, F., Gonzalez, E. **2006**. Typing of intimin (eae) genes from enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) isolated from children with diarrhoea in Montevideo, Uruguay: identification of two novel intimin variants (μ B and ξ R/ β 2B). *J. Med. Microbiol.* 55: 1165-1174.

Bortolaia, V., Kaas, R., Ruppe, E., Roberts, M., Schwarz, S., Cattoir, V., Philippon, A., *et al.* **2020**. ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 1-10.

Braga, V., Vázquez, S., Vico, V., Pastorino, V., Mota, I., Legnani, M., Schelotto, F., Lancibidad, G., Varela, G. **2017**. Prevalence and characteristics of *Listeria monocytogenes* strains isolated from foods in Montevideo-Uruguay. *Brazilian Journal of Microbiology.* 48: 689-694.

Brunder, W., Schmidt, H., Karch, H. **1996**. KatP, a novel catalase peroxidase encoded by the large plasmid of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Microbiol.* 142: 3305–3315.

Brusa, V., Costa, M., Padola, N., Etcheverría, A., Sampedro, F., Fernandez, P., *et al.* **2020**. Quantitative risk assessment of haemolytic uremic syndrome associated with beef consumption in Argentina. *PLoS ONE.* 15(11): e0242317.

Buchholz, U., Bernard, H., Werber, D., Böhmer, M., Remschmidt, C., Wilking, H., Deleré, Y., an der Heiden, M., Adlhoch, C., Dreesman, J., *et al.* **2011**. German outbreak of *Escherichia coli* O104:H4 associated with sprouts. *N. Engl. J. Med.* 365: 1763–1770.

Byrne, L., Vanstone, G., Perry, N., Launders, N., Adak, G., Godbole, G., Grant, K., Smith, R., Jenkins, C. **2014**. Epidemiology and microbiology of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* other than serogroup O157 in England, 2009-2013. *J. Med. Microbiol.* 63: 1181–1188.

Callaway, T.R., Carr, M.A., Edrington, T.S., Anderson, R.C., Nisbet, D.J. **2009**. Diet, *Escherichia coli* O157:H7, and cattle: a review after 10 years. *Curr Issues Mol Biol.* 11(2): 67–79.

CDC. **1993**. Update: Multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections from hamburgers—western United States, 1992–1993. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 42: 258–263.

CDC. **2006.** *Multistate Outbreak of E. coli O157 Infections, November–December 2006* (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta), www.cdc.gov/ecoli/2006/december/121406.htm

CDC. **2008.** *Escherichia coli* O157:H7 infections in children associated with raw milk and raw colostrum from cows—California, 2006. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 57: 625– 628.

Clarke, S., Haigh, R., Freestone, P., Williams, P. **2003.** Virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*, a global pathogen. *Clin. Microbiol Rev.* 16: 365–378.

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). **2019.** Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: 29th ed. CLSI Supplement M100. Wayne, Pennsylvania, USA.

Clogher, P., Hurd, S., Hoefler, D., Hadler, J., Pasutti, L., Cosgrove, S., Segler, S., Tobin-D’Angelo, M., Nicholson, C., Booth, H., *et al.* **2012.** Assessment of physician knowledge and practices concerning Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection and enteric illness, 2009, Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet). *Clin. Infect. Dis.* 54 Suppl 5, S446-452.

Cocchi, S., Grasselli, E., Gutacker, M., Benagli, C., Convert, M., Piffaretti, J.C. **2007.** Distribution and characterization of integrons in *Escherichia coli* strains of animal and human origin. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 50 (1): 126-132.

Cointe, A., Birgy, A., Mariani-Kurkdjian, P., Liguori, S., Courroux, C., Blanco, J., Delannoy, S., Fach, P., Loukiadis, E., Bidet, P., *et al.* **2018.** Emerging Multidrug-Resistant Hybrid Pathotype Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O80 and Related Strains of Clonal Complex 165, Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 24: 2262–2269.

Colavita G. Igiene e tecnologie degli alimenti di origine animale. Ed. Le Point Veterinaire Italie Srl, Milan, Italy, **2012**, 448 pp.

Colello, R., Krüger, A., Conza, J.D., Rossen, J.W.A., Friedrich, A.W., Gutkind, G., *et al.* **2018.** Antimicrobial Resistance in Class 1 Integron-Positive Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolated from Cattle, Pigs, Food and Farm Environment. *Microorganisms.* 6: 99.

Colello, R., Krüger, A., Velez, M. V., Del Canto, F., Etcheverría, A. I., Vidal, R., Padola, N. **2019**. Identification and detection of iha subtypes in LEE-negative Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains isolated from humans, cattle and food. *Heliyon*. 5(12): e03015.

Colomer-Lluch, M., Jofre, J., Muniesa, M. **2011a**. Bacteriophages carrying antibiotic resistance genes in fecal wastes from cattle, pigs and poultry. *Antimicrob Agents Chemother*. 55 (10): 4908-4911.

Colomer-Lluch, M., Jofre, J., Muniesa, M. **2011b**. Antibiotic resistance genes in the bacteriophage DNA fraction of environmental samples. *PLoS One*. 6(3): e17549.

Dean, P. **2011**. Functional domains and motifs of bacterial type III ejector proteins and their roles in infection. *FEMS Microbiol Rev*. 35: 1100–1125.

Denamur, E., Clermont, O., Bonacorsi, S., Gordon, D. **2020**. The population genetics of pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews | Microbiology*. Publicado on line agosto 2020. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0416-x>

De Rauw, K., Jacobs, S., Piérard, D. **2018**. Twenty-seven years of screening for Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in a university hospital. Brussels, Belgium, 1987–2014. *PLoS ONE*. 13, e0199968.

Dhakal, B., Mulvey, M. **2012**. The UPEC pore forming toxin α -Hemolysin triggers proteolysis of host proteins to disrupt cell adhesion, inflammatory and survival pathways. *Cell Host Microbe*. 11(1): 58-69.

Ding, W., Baumdicker, F., Neher, R. **2018**. panX: pan-genome analysis and exploration. *Nucleic Acids Research*. 46 (1), e5. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx977>

Edgar, R., & Bibi, E. **1997**. MdfA, an *Escherichia coli* multidrug resistance protein with an extraordinarily broad spectrum of drug recognition. *Journal of bacteriology*. 179(7): 2274–2280.

EFSA. **2009**. SCIENTIFIC REPORT OF EFSA Technical specifications for the monitoring and reporting of verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) on animals and food (VTEC surveys on animals and food). *EFSA Journal 2009*. 7(11):1366.

EFSA BIOHAZ. **2013**. Scientific opinion on VTEC-seropathotype and scientific criteria regarding pathogenicity assessment. *EFSA J.* 11, 3138 pp.

EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control), 2018. **2018**. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and foodborne outbreaks in 2017. *EFSA Journal*. 16(12):5500, 228 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5500>

EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control), 2019. **2019**. The European Union One Health 2018 Zoonoses Report. *EFSA Journal*. 17(12):5926, 276 pp.

EFSA BIOHAZ Panel, Koutsoumanis, K., Allende, A., Alvarez-Ordóñez, A., Bover-Cid, S., Chemaly, M., Davies, R., *et al.* **2020**. Scientific Opinion on the pathogenicity assessment of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and the public health risk posed by contamination of food with STEC. *EFSA Journal* 2020. 8(1):5967, 105 pp.

Ewing, W. The genus *Escherichia coli*. En: Edwards and Ewing's identification of Enterobacteriaceae, 4th. ed. Elsevier: New York, **1985**, 93-134 p.

FAO. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and food: attribution, characterization, and monitoring – Report. Roma, **2018**, 174 p.

Farfán, A., Ariza, S., Vargas, F., Vargas, L. **2016**. Mecanismos de virulencia de *Escherichia coli* enteropatógena. *Rev Chilena Infectol.* 33(4): 438-450.

Farfan, M., Cantero, L., Vidal, R., Botkin, D., Torres, A. **2011**. Long polar fimbriae of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 bind to extracellular matrix proteins. *Infection and immunity.* 79(9), 3744–3750.

FDA. **2007**. *Nationwide E. coli O157:H7 Outbreak: Questions & Answers* (Food and Drug Administration, Rockville, MD), www.cfsan.fda.gov/dms/spinacqa.html#howmany.

Feil, E., Li, B., Aanensen, D., Hanage, W., Spratt, B. **2004**. eBURST: Inferring Patterns of Evolutionary Descent among Clusters of Related Bacterial Genotypes from Multilocus Sequence Typing Data. *Journal of Bacteriology.* 186:1518–1530.

Fierz, L., Cernela, N., Hauser, E., Nüesch-Inderbinen, M., Stephan, R. **2017**. Characteristics of Shigatoxin-Producing *Escherichia coli* Strains Isolated during 2010-2014 from Human Infections in Switzerland. *Front. Microbiol.* 8: 14/1.

Freedman, S., Xie, J., Neufeld, M., Hamilton, W., Hartling, L., Tarr P., *et al.* **2016**. Shiga Toxin–Producing *Escherichia coli* Infection, Antibiotics, and Risk of Developing Hemolytic Uremic Syndrome: A Meta-analysis. *Clin Infect Dis.* 62:1251-1258.

Friedrich, A., Bielaszewska, M., Zhang, W., Pulz, M., Kuczius, T., Ammon, A., Karch, H. **2002**. *Escherichia coli* harboring Shiga toxin 2 gene variants: frequency and association with clinical symptoms. *J. Infect. Dis.* 185: 74–84.

Friesema, I., Zwaluw, K., van der Schuurman, T., Kooistra-Smid, M., Franz, E., van Duynhoven, Y., van Pelt, W. **2014**. Emergence of *Escherichia coli* encoding Shiga toxin 2f in human Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) infections in the Netherlands, January 2008 to December 2011. *Eurosurveillance* 2014. 19.

Fu, S., Bai, X., Fan, R., Sun, H., Xu, Y, Xiong, Y. **2018**. Genetic diversity of the enterohaemolysin gene (ehxA) in non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains in China. *Sci Rep.* 8:4233.

Fujii, J., Mizoue, T., Kita, T., Kishimoto, H., Joh, K., Nakada, Y., *et al.* **2016**. Risk of haemolytic uraemic syndrome caused by shiga-toxin-producing *Escherichia coli* infection in adult women in Japan. *Epidemiol Infect.* 144(5): 952-61.

Fuller, C., Pellino, C., Flagler, M., Strasser, J., Weiss, A. **2011**. Shiga toxin subtypes display dramatic differences in potency. *Infect. Immun.* 79: 1329–1337.

Gadea, M., Deza, N., Mota M., Carbonari, C., Robato, M., *et al.* **2012**. Two cases of urinary tract infection caused by Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 strains. *Revista Argentina de Microbiología.* 44: 94-96.

Gadea, M., Varela, G., Bernadá, M., Sirok, A., Mota, M., Sabelli, R., *et al.* **2004**. Primer aislamiento en Uruguay de *Escherichia coli* productora de toxina Shiga del serotipo O157:H7 en una niña con síndrome urémico hemolítico. *Revista Médica Del Uruguay.* 20: 79.

Gallego V, Deza N, Carbonari C, Gugliada J, Stambulian J, Repetto H, *et al.* **2006.** Detección de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga (STEC) en adultos asintomáticos que conviven con mascotas. VI Congreso Argentino de la Sociedad Argentina de Infectología. Mar del Plata, Argentina.

Gannon, V., Rashed, M., King, R., Thomas, E. **1993.** Detection and characterization of the *eae* gene of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* using Polymerase Chain Reaction. *J. Clin. Microbiol.* 31: 1268-1274.

Gardette, M., Le Hello, S., Mariani-Kurkdjian, P., Fabre, L., Gravey, F., Garrivier, A., Loukiadis, E., Jubelin, G. **2019.** Identification and prevalence of in vivo-induced genes in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Virulence.* 10: 180–193.

Garmendia, J., Phillips, A., Chong, Y., Schuller, S., Marches, O., Dahan, S., Oswald, E., Shaw, R., Knutton, S., Frankel, G. **2004.** TccP is an enterohaemorrhagic *E. coli* O157:H7 type III effector protein that couples Tir to the actin-cytoskeleton. *Cell. Microbiol.* 6: 1167–1183.

Garmendia, J., Ren, Z., Tennant, S., Aparecida, M., Viera, M., Chong, Y., Whale, A., Azzopardi, K., Dahan, S., Palma Sircili, M., Franzolin, M., Trabulsi, R., Phillips, A., Gomes, T., Xu, J., Robins-Browne, R., Frankel G. **2005.** Distribution of *tccP* in Clinical Enterohemorrhagic and Enteropathogenic *Escherichia coli* Isolates. *Journal of Clinical Microbiology.* 43(11): 5715–5720.

Garmendia, J., Carlier, M., Egile, C., Didry, D., Frankel, G. **2006.** Characterisation of TccP-mediated N-WASP activation during enterohaemorrhagic *Escherichia coli* infection. *Cell. Microbiol.* 8: 1444–1455.

Gaytán, M., Martínez, V., Soto, E., Gonzalez, B. **2016.** Type III Secretion System in Attaching and Effacing Pathogens. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 6: 129.

Goswami, K., Chen, C., Xiaoli, L., Eaton, K., Dudley, E. **2015.** Coculture of *Escherichia coli* O157:H7 with a Nonpathogenic *E. coli* strain increases toxin production and virulence in a Germfree Mouse model. *Infection and Immunity.* 83: 4185–4193.

Gould, L., Mody, R., Ong, K., Clogher, P., Cronquist, A., Garman, K., White, P. **2013**. Griffin for the Emerging Infections Program FoodNet Working Group PM. Increased recognition of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in the United States during 2000-2010: Epidemiologic features and comparison with *E. coli* O157 infections. *Foodborne Pathog Dis.* 10: 453-460.

Green, M. & Sambrook, J. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York, **2012**, 4^{ta} ed, 1885 pp.

Grispoldi, L., Bertero, F., Franceschini, S., Mastrosimone, F., Sechi, P., Iulietto, M., Beniamino M., Cenci-Goga, T. **2017**. Prevalence and characterization of shigatoxigenic *Escherichia coli* isolated from beef cattle fed with prebiotics. *Italian Journal of Food Safety.* 6 (6958): 185-190.

Gyles, C. **2007**. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: An overview. *J Anim Sci.* 85: E45-E62.

Hammer & Harper, Ryan PD. 2001. PAST: paleontological statistic software package for education and data analysis. *Palaeontol Electronica.* 4(1): 1-9.

Hauser, E., Mellmann, A., Semmler, T., Stoeber, H., Wieler, L., Karch, H., Kuebler, N., Fruth, A., Harmsen, D., Weniger, T., Tietze, E., Schmidta H. **2013**. Phylogenetic and Molecular Analysis of Food-Borne Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology.* 49 (8): 2731-2740.

Hicks, S., & Galan, J. **2010**. Hijacking the host ubiquitin pathway: structural strategies of bacterial E3 ubiquitin ligases. *Curr. Opin. Microbiol.* 13 (1): 1-12.

Holmes, A., Allison, L., Ward, M., Dallman, T., Clark, R., Fawkes, A., Murphy, L., Hanson, M. **2015**. Utility of Whole-Genome Sequencing of *Escherichia coli* O157 for Outbreak Detection and Epidemiological Surveillance. *J. Clin. Microbiol.* 53: 3565-3573.

Ikeda, K., Ida, O., Kimoto, K., Takatorige, T., Nakanishi, N., Tatara, K. **1999**. Effect of early fosfomycin treatment on prevention of hemolytic uremic syndrome accompanying *Escherichia coli* O157:H7 infection. *Clin. Nephrol.* 52: 357-62.

Illumina.com. **2010**. Technology spotlight: Illumina Sequencing [Sede Web]. Illumina. [acceso 25 de mayo de 2020]. Disponible en:

http://www.illumina.com/documents/products/techspotlights/techspotlight_sequencing.pdf

Illumina. **2015**. An introduction to Next-Generation Sequencing Technology [Sede Web]. Illumina. [acceso 25 de mayo de 2020]. Disponible en: https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/illumina_sequencing_introduction.pdf

Imamovic, L., Jofre, J., Schmidt, H., Serra-Moreno, R., Muniesa, M. **2009**. Phage-mediated Shiga toxin 2 gene transfer in food and water. *Appl Environ Microbiol.*75(6): 1764-1768.

Imamovic, L., Serra-Moreno, R., Jofre, J., Muniesa, M. **2010a**. Quantification of Shiga toxin encoding bacteriophages, by real-time PCR and correlation with phage infectivity. *J Appl Microbiol.*,108(3): 1105-14.

Imamovic, L., Ballesté, E., Jofre, J., Muniesa, M. **2010b**. Quantification of Shiga toxinconverting bacteriophages in wastewater and in fecal samples by realtime quantitative PCR. *Appl Environ Microbiol.*76: 5693-5701.

Imamovic, L., Muniesa, M. **2011**. Quantification and evaluation of infectivity of shiga toxinencoding bacteriophages in beef and salad. *Appl Environ Microbiol.* 77: 3536-3540.

Imamovic, L., Muniesa, M. **2012**. Characterizing RecA-Independent Induction of Shiga toxin2-Encoding Phages by EDTA Treatment. *PLoS ONE.* 7(2): e32393. Corregido en **2018**, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193475>

INAC. **2020**. Informe Estadístico Año Agrícola. Información referida al período Julio 2019 - Junio 2020. *Instituto Nacional de Carne*.

https://www.inac.uy/innovaportal/v/18513/10/innova.front/informe-estadistico-ano-agricola-2019_2020

Jackman, S., Vandervalk, B., Mohamadi, H., Chu, J., Yeo, S., Hammond, A., Jahesh, G., Khan, H., Coombe, L., Warren, R., Birol, I. **2017**. ABySS 2.0: Resource-efficient assembly of large genomes using a Bloom filter. *Genome research.* 27(5), 768-777.

Jerse, A., Yu, J., Tall, B., Kaper, J. **1990**. A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87: 7839 – 7843.

Johannes, L., Römer, W. **2010**. Shiga toxins—From cell biology to biomedical applications. *Nat. Rev. Microbiol.* 8: 105–116.

Joseph, A., Cointe, A., Mariani, Kurkdjian, P., Rafat C., Hertig, A. **2020**. Shiga Toxin-Associated Hemolytic Uremic Syndrome: A Narrative Review. *Toxins.* 12(67): 1-45.

Joshi NA, Fass JN. **2011**. Sickle: A sliding-window, adaptive, quality-based trimming tool for FastQ files (Version 1.33) [Software]. Available at <https://github.com/najoshi/sickle>.

Kado, C., y Liu, T. **1981**. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol.* 145: 1365–1373.

Kaper, J., Nataro, J. Mobley H. **2004**. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* 2: 123–140.

Karmali, M., Mascarenhas, M., Shen, S., Ziebell, K., Johnson, S., Reid-Smith, R., Isaac-Renton, J., Clark, C., Rahn, K., Kaper, J. **2003**. Association of Genomic O Island 122 of *Escherichia coli* EDL 933 with Verocytotoxin-Producing *Escherichia coli* Seropathotypes That Are Linked to Epidemic and/or Serious Disease. *Journal of Clinical Microbiology.* 41: 4930–4940.

Karmali, M. **2004**. Infection by Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. *Mol. Biotechnol.* 26: 117–122.

Kavaliauskiene, S., Dyve Lingelem, A., Skotland, T., Sandvig, K. **2017**. Protection against Shiga Toxins. *Toxins.* 9: 44.

Kerner, K., Bridger, P., Kopf, G., Frohlich, J., Barth, S., Willems, H., et al. **2015**. Evaluation of biological safety in vitro and immunogenicity in vivo of recombinant *Escherichia coli* Shiga toxoids as candidate vaccines in cattle. *Vet Res.* 46:38.

Kimmit, P., Harwood, C., Barer, M. **2000**. Toxin Gene Expression by Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*: the Role of Antibiotics and the Bacterial SOS Response. *Emerging Infectious Diseases*. 6(5): 458-465.

Knodler, L., Winfree, S., Drecktrah, D., Ireland, R., Steele-Mortimer, O. **2009**. Ubiquitination of the bacterial inositol phosphatase, SopB, regulates its biological activity at the plasma membrane. *Cell Microbiol*. 11: 1652–1670.

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

Krüger, A., Lucchesi, P., Parma, A. **2011**. Verotoxins in bovine and meat verotoxin-producing *Escherichia coli* isolates: type, number of variants, and relationship to cytotoxicity. *Applied and Environmental Microbiology*. 77, 73-79.

Kudva, I. **2012**. In vitro adherence patterns of *Shigella* serogroups to bovine recto-anal junction squamous epithelial (RSE) cells are similar to those of *Escherichia coli* O157. *Foodborne Path Dis*. 9: 346–351.

Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K. **2016**. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*. 33:1870-1874.

Kuzminov A. **1999**. Recombinational repair of DNA damage in *Escherichia coli* and bacteriophage lambda. *Microbiol Mol Biol Rev*. 63:751–813.

Lang, Ch., Fruth, A., Holland, G., Laue, M., Mühlen S., Dersch, P., Flieger, A. **2018**. Novel type of pilus associated with a Shigatoxigenic *E. coli* hybrid pathovar conveys aggregative adherence and bacterial virulence. *Emerging Microbes & Infections*. 7: 203.

Leotta, G., Linares, L., Ortega, E., Adriani, C. **2014**. Carnicerías saludables. Laboratorio de Microbiología de los Alimentos. Ed: Instituto de Genética Veterinaria “Ing. Fernando Noel Dulout”. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata / CONICET. 40 p.

Lienemann, T., Salo, E., Rimhanen-Finne, R., Rönholm, K., Taimisto, M., Hirvonen, J., et al. **2012**. Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* Serotype O78:H– in Family, Finland, 2009. *Emerging Infectious Diseases*. 18(4): 577-581.

Loneragan, G., Brashears, M. **2005**. Pre-harvest interventions to reduce carriage of *E. coli* O157 by harvest-ready feedlot cattle. *Meat Sci.* 71: 72–78.

Lorenz, S., Son, I., Maounounen-Laasri, A., Lin, A., Fischer, M., Kasea, J. **2013**. Prevalence of Hemolysin Genes and Comparison of *ehxA* Subtype Patterns in Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STEC) and NonSTEC Strains from Clinical, Food, and Animal Sources. *Applied and Environmental Microbiology.* 79(20): 6301-6311.

Low, A., Dziva, F., Torres, A., Martinez, J. L., Rosser, T., Naylor, S., Spears, K., Holden, N., Mahajan, A., Findlay, J., Sales, J., Smith, D. G., Low, J., Stevens, M., Gally, D. L. **2006**. Cloning, expression, and characterization of fimbrial operon F9 from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infection and immunity.* 74(4), 2233–2244.

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

Majowicz, S., Scallan, E., Jones-Bitton, A., Sargeant, J., Stapleton, J., Angulo, F., Yeung, D., Kirk, M. **2014**. Global incidence of human Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections and deaths: A systematic review and knowledge synthesis. *Foodborne Pathog. Dis.* 11: 447–455.

Manning, S., Motiwala, A., Springman, C., Qi, W., Lacher, D., Ouellette, L., Mladonicky, J., Somsel, P., Rudrik, J., Dietrich, S., Zhang, W., Swaminathan, B., Alland, D., Whittam, T. **2008**. Variation in virulence among clades of *Escherichia coli* O157:H7 associated with disease outbreaks. *PNAS.* 105 (12): 4868-4873.

Marche`s, O., Covarelli, V., Dahan, S., Cougoule, C., Bhatta, P., Frankel, G., Caron. E. **2008**. *EspJ* of enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* inhibits opsono-phagocytosis. *Cell. Microbiol.* 10: 1104–1115.

Mariani-Kurkdjian, P., Lemaître, C., Bidet, P., Perez, D., Boggini, L., Kwon, T., Bonacorsi, S. **2014**. Haemolytic-uraemic syndrome with bacteraemia caused by a new hybrid *Escherichia coli* pathotype. *New Microbes New Infect.* 2: 127–131.

Matussek, A., Einemo, I.-M., Jogenfors, A., Löfdahl, S., Löfgren, S. **2016**. Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in Diarrheal Stool of Swedish Children: Evaluation of Polymerase Chain Reaction Screening and Duration of Shiga Toxin Shedding. *J. Pediatr. Infect. Dis. Soc.* 5: 147–151.

Matussek, A., Jernberg, C., Einemo, I. *et al.* **2017**. Genetic makeup of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in relation to clinical symptoms and duration of shedding: a microarray analysis of isolates from Swedish children. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 36: 1433–1441.

McDaniel, T., Jarvis, K., Donnenberg, M., Kaper, J. **1995**. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92: 1664–1668.

Melli, L., Ciocchini, A., Caillava, A., Voza, N., Chinen, I., Rivas, M., Feldman, M., Ugalde, J., Comerc, D. **2015**. Serogroup-Specific Bacterial Engineered Glycoproteins as Novel Antigenic Targets for Diagnosis of Shiga Toxin Producing *Escherichia coli* Associated Hemolytic Uremic Syndrome. *J. Clin. Microbiol.* 53(2): 528-38.

Mellmann, A., Bielaszewska, M., Kock, R., Friedrich, A.W., Fruth, A., Middendorf, B., Harmsen, D., Schmidt, M.A., Karch, H., **2008**. Analysis of collection of hemolytic uremic syndrome-associated enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Emerg. Infect. Dis.* 14; 1287–1290.

Mellor, G., Sim E., Barlow, R., D’Astek, B., Galli, L., Chinen, I., Rivas, M., Gobiusa, K. **2012**. Phylogenetically Related Argentinean and Australian *Escherichia coli* O157 Isolates Are Distinguished by Virulence Clades and Alternative Shiga Toxin 1 and 2 Prophages. *Applied and Environmental Microbiology.* 78(13): 4724-4731.

Menezes, M., Aires, K., Ozaki, C., Ruiz, R., Pereira, M., Abreu, P., Elias, W., Ramos, O., Piazza, R. **2011**. Cloning approach and functional analysis of anti-intimin single-chain variable fragment (scFv). *BMC research notes*, 4, 30. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-4-30>

Mir, R., Kudva, I. **2019**. Antibiotic-resistant Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: An overview of prevalence and intervention strategies. *Zoonoses Public. Health.* 66 (1): 1-13.

Mir, R., Brunelle, B., Alt, D., Arthur, T., Kudva, I. **2020**. Supershed *Escherichia coli* O157:H7 Has Potential for Increased Persistence on the Rectoanal Junction Squamous Epithelial Cells and Antibiotic Resistance. *International journal of microbiology*. 2368154, 16 pp.

Monaghan, A., Byrne, B., Fanning, S., Sweeney, T., McDowell, D., Bolton, D. Serotypes and virulence profiles of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from bovine farms. **2011**. *Appl Environ Microbiol*. 77(24):8662-8.

Mühlen, S., Dersch, P. **2020**. Treatment Strategies for Infections with Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. *Front. Cell. Infect. Microbiol*. 10:169. doi: 10.3389/fcimb.2020.00169

Muniesa, M., Allué-Guardia, A Martínez-Castillo. **2013**. Bacteriophage-driven emergence of novel pathogens. *Future Virology*. 8(4): 323-325.

Muniesa, M., Imamovic, L., Jofre, J. **2011**. Bacteriophages and genetic mobilization in sewage and faecally polluted environments. *Microb Biotechnol*. 4(6): 725–734.

Muniesa M, Jofre J, GarcíaAljaro C, Blanch A. **2006**. Occurrence of *E. coli* O157:H7 and other enterohemorrhagic *Escherichia coli* in the environment. *Environ Sci Technol*. 40:7141-7149.

Murphy, F., Fauquet, C., Bishop, D., Ghabrial, S., Jarvis, A., Martelli, G., Mayo, M., Summers, M. **1995**. Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses. Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Ed: Springer-Verlag.

Nagachinta, S., Chen, J. **2009**. Integron-Mediated Antibiotic Resistance in Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. *Journal of Food Protection*. 72 (1): 21–27.

Nagachinta, S., Chen, J. **2008**. Transfer of Class 1 Integron-Mediated Antibiotic Resistance Genes from Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* to a Susceptible *E. coli* K-12 Strain in Storm Water and Bovine Feces. *Applied and Environmental Microbiology*. 74 (16): 5063-5067.

Nart, P., Holden, N., McAteer, S., Wang, D., Flockhart, A., Naylor, S., Low, J., Gally, D., Huntley, J. **2008**. Mucosal antibody responses of colonized cattle to *Escherichia coli* O157-secreted proteins, flagellin, outer membrane proteins and lipopolysaccharide. *FEMS Immunol. Med. Microbiol*. 52: 59–68.

- Nataro, J., Kaper, J. **1998**. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 11: 142-201.
- Nüesch-Inderbinen, M., Cernela, N., Wüthrich, D., Egli, A., Stephan, R. 2018. Genetic characterization of Shiga toxin producing *Escherichia coli* belonging to the emerging hybrid pathotype O80:H2 isolated from humans 2010-2017 in Switzerland. *Int. J. Med. Microbiol.* 308: 534–538.
- Nuñez-Oresa, L., Georgellis, D., Alvarez, A., **2014**. ARCB: EL SENSOR DEL ESTADO REDOX EN BACTERIAS. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas.* 17(2): 135-146.
- Nurk, S., Bankevich, A., Antipov, D., Gurevich, A., *et al.* **2013**. Assembling Genomes and Mini-metagenomes from Highly Chimeric Reads. In: Deng M., Jiang R., Sun F., Zhang X. (eds) *Research in Computational Molecular Biology*. RECOMB 2013. Lecture Notes in Computer Science, vol 7821. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-37195-0_13.
- Oderiz, S., Leotta G., Galli, L. **2018**. Detección y caracterización de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga en niños atendidos en un hospital pediátrico interzonal de la ciudad de La Plata. *Revista Argentina de Microbiología.* 50(4): 341-350.
- Ogura, Y., Ooka, T., Whale, A., Garmendia, J., Beutin, L., Tennant, Sh., *et al.* **2007**. TccP2 of O157:H7 and Non-O157 Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC): Challenging the Dogma of EHEC-Induced Actin Polymerization. *Infection and Immunity.* 75 (2): 604-612.
- Ogura, Y., Ooka, T., Iguchi, A., Toh, H., Asadulghani, M., Oshima, K., Kodama, T., Abe, H., Nakayama, K., Kurokawa, K., Tobe, T., Hattori, M., Hayashi, T. **2009**. Comparative genomics reveal the mechanism of the parallel evolution of O157 and non-O157 enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 106:17939–44.
- Orskov, F., Orskov, I. **1984**. Serotyping of *Escherichia coli*. *Meth Microbiol.* 14 (3): 43–112.
- Oswald, E., Schmidt, H., Morabito, S., Karch, H., Marchès, O., Caprioli, A. **2000**. Typing of intimin genes in human and animal Enterohemorrhagic and Enteropathogenic *Escherichia coli*: characterization of a new intimin variant. *Infection and Immunity.* 68: 64-71.

Parma, A., Sanz, M., Blanco, J., Blanco, J., Vinas, M., Blanco, M., Padola, N., Etcheverria A. **2000**. Virulence genotypes and serotypes of verotoxigenic *Escherichia coli* isolated from cattle and foods in Argentina. Importance in public health. *Eur. J. Epidemiol.* 16: 757-762.

Passmore, L., & Barford, D. **2004**. Getting into position: the catalytic mechanisms of protein ubiquitylation. *Biochem J.* 379: 513–525.

Pistone, V., Venzano, A., Vilte, D., Mercado, E., Ibarra, C. **2005**. *Escherichia coli* enterohemorrágica aislada de terneros con diarrea sanguinolenta produce efecto citotóxico en colon humano. *Rev Arg Microbiol.* 37: 117-121.

Pollard, D., Johnson, W., Lior, H., Tyler S., Rozee, K. **1990**. Rapid and Specific Detection of Verotoxin Genes in *Escherichia coli* by the Polymerase Chain Reaction. *J. Clin. Microbiol.* 28(3): 540-545.

Pradel, N., Bertin, Y., Martin, C., Livrelli, V. **2008**. Molecular Analysis of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Strains Isolated from Hemolytic-Uremic Syndrome Patients and Dairy Samples in France. *Applied and Environmental Microbiology.* 74(7): 2118–2128.

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

Rangel, J., Sparling, P., Crowe, C., Griffin, P., Swerdlow, D. **2005**. Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 Outbreaks, United States, 1982–2002. *Emerg. Infect. Dis.* 11: 603–609.

Rivas, M., Miliwebsky, E., Chinen, I., Roldán, C.D., Balbi, L., García, B., Fiorilli, G., Sosa-Estani, S., Kincaid, J., Rangel, J., *et al.* **2006**. Characterization and epidemiologic subtyping of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from hemolytic uremic syndrome and diarrhea cases in Argentina. *Foodborne Pathog. Dis.* 3, 88–96.

Ribot, E., Fair, M., Gautom, R., Cameron, D., Hunter, S., Swaminathan, B., Barrett, T. **2006**. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. *Foodborne Pathog Dis.* 3: 59-67.

Riordan, J., Viswanath, S., Manning, Sh., Whittam, T. Genetic Differentiation of *Escherichia coli* O157:H7 Clades Associated with Human Disease by Real-Time PCR. **2008**. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(6): 2070-2073.

Rivas, M., Chinen, I., Guth, B.E.C. **2016**. Enterohemorrhagic (Shiga Toxin-Producing) *Escherichia coli*. In: Torres A. (eds) *Escherichia coli in the Americas*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-45092-6_5

Robins, R., Holt, K., Ingle, D., Hocking, D., Yang, J., Tauschek, M. **2016**. ¿Are *Escherichia coli* Pathotypes Still Relevant in the Era of Whole-Genome Sequencing? *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 6:141. doi: 10.3389/fcimb.2016.00141.

Saile, N., Schuh, E., Semmler, T, Eichhorn, I., Wieler, L., Bauwens, A., Schmidt H. **2018**. Determination of virulence and fitness genes associated with the pheU, pheV and selC integration sites of LEE-negative food-borne Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains. *Gut Pathog* 10, 43 (2018). <https://doi.org/10.1186/s13099-018-0271-8>.

Salvadori, M., Sontrop, J., Garg, A., Moist, L., Suri, R., Clark, W. **2009**. Factors that led to the Walkerton tragedy. *Kidney Int. Suppl.*, S33–S34. doi:10.1038/ki.2008.616.

Sanchez, A., Guerrero, R. *Genética Molecular Bacteriana*. Editorial Reverte: Barcelona, **1982**, 456 pp.

Santos, A., Santos, F., Silva, R., Gomes, T. **2020**. Diversity of Hybrid and Hetero-Pathogenic *Escherichia coli* and Their Potential Implication in More Severe Diseases. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 10:339.

Sasaki, Y., Usui, M., Murakami, M., Haruna, M., Kojima, A., Asai, T., Yamada, T. **2012**. Antimicrobial resistance in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 and O26 isolates from beef cattle. *Jpn. J. Infect. Dis.* 65, 117-21.

Scheutz, F., Teel, L., Beutin, L., Pierard D., Buvens G., Karch, H., Mellmann A., Capriolo, A., Tozzoli, R., Morabito, S., Strockbine, N., Melton-Celsa, A., Sanchez, M., Persson, S., O'Brien, A. **2012**. Multicenter Evaluation of a Sequence-Based Protocol for Subtyping Shiga Toxins and Standardizing Stx Nomenclature. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(9): 2951-2963.

- Schmidt, H. **2001**. Shiga-toxin-converting bacteriophages. *Res. Microbiol.* 152: 687– 695.
- Schmidt, H.L., Zhang, L., Hemmrich, U., Jelasic, S., Brunder, W., Tarr, P.I., Dobrindt, U., Hacker, J., Karch, H. **2001**. Identification and characterization of a novel genomic island integrated at selC in locus of enterocyte effacement-negative Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 69, 6863–6873.
- Serra-Moreno, R., Jofre, J., Muniesa, M. **2008**. The CI repressors of Shiga toxin converting prophages are involved in coinfection of *E. coli* strains, which causes a down regulation in the production of Shiga toxin 2. *J Bacteriol.* 190: 4722-4735.
- Serra-Moreno, R., Jofre, J., Muniesa, M. **2007**. Insertion site occupancy by Stx2 bacteriophages depends on the locus availability of the host strain chromosome. *J. Bacteriol.* 189: 6645– 6654.
- Sokal, R. R. & Rohlf, F. J. **1998**. Biometry: the principles and practice of statistics in biological research. Ed. Freeman & Co. 896 pp.
- Souza, V., Castillo, A., Rocha, M., Sandner, L., Silva, C., Eguiarte, Luis. **2001**. Ecología evolutiva de *Escherichia coli*. *Interciencia.* 26(10), 513-517.
- Soysal, N., Mariani-Kurkdjian, P., Smail, Y., Liguori, S., Gouali, M., Loukiadis, E., Fach, P., Bruyand, M., Blanco, J., Bidet, P., et al. **2016**. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Hybrid Pathotype O80:H2 as a New Therapeutic Challenge. *Emerg. Infect. Dis.* 22: 1604–1612.
- Terajima, J., Izumiya, H., Hara-Kudo, Y., Ohnishi, M. **2017**. Shiga Toxin (Verotoxin)-producing *Escherichia coli* and Foodborne Disease: A Review. *Food. Saf. (Tokyo).* 5 (2):35-53.
- Tobe, T., Tatsuno, I., Katayama, E., Wu Ch., Schoolnik, G., Sasakawa, Ch. **1999**. A novel chromosomal locus of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC), which encodes a bfpT-regulated chaperone-like protein, TrcA, involved in microcolony formation by EPEC. *Molecular Microbiology.* 33(4): 741-752.
- Torres, A., Blanco, M., Valenzuela, P., Slater, T., Patel S., Dahbi, G., López, C., Barriga, X., Blanco, J., Gomes, T., Vidal, R., Blanco, J. **2009**. Genes related to long polar fimbriae of pathogenic *Escherichia coli* strains as reliable markers to identify virulent isolates. *J. Clin. Microbiol.* 47: 2442–2451.

Tóth, I., Schmidt, H., Kardos, G., Lancz, Z., Creuzburg, K., Damjanova, I., Paszti, J., Beutin, L., Nagy, B. **2009**. Virulence Genes and Molecular Typing of Different Groups of *Escherichia coli* O157 Strains in Cattle. *Applied and Environmental Microbiology*. 75(19): 6282-6291.

Touchon, M., Perrin, A., de Sousa, J.A.M., Vangchhia, B, Burn, S., O'Brien, C.L., *et al.* **2020** Phylogenetic background and habitat drive the genetic diversification of *Escherichia coli*. *PLoS Genet*. 16(6): e1008866.

Trabulsi, L., Keller, R., Tardelli, T. **2002**. Typical and Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Emerging Infectious Diseases*. 8(5): 508-513.

Tuttle, J., Gomez, T., Doyle, M., Wells, J., Zhao, T., Tauxe, R., Griffin, P. **1999**. Lessons from a large outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections: Insights into the infectious dose and method of widespread contamination of hamburger patties. *Epidemiol. Infect.* 122: 185–192.

USDA. 2021. Timeline of Events Related to *E. coli* O157:H7. <https://www.fsis.usda.gov/wps/portal/fsis/home> (acceso enero 2021)

Varela, G., Chinen, I., Gadea, M., Mota, M., *et al.* **2008**. Detección y caracterización de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga (STEC) a partir de casos clínicos y de alimentos en Uruguay. *Revista Argentina de Microbiología*. 40: 93 – 100.

Varela G., Schelotto, F. **2015**. Síndrome urémico hemolítico en Uruguay. Aspectos microbiológicos y clínicos, aportes para su conocimiento regional. *Rev. Fac. Cienc. Salud UDES*. 2(1): 25-30.

Walsh, M., Dodd, J., Hautbergue, G. **2013**. Ribosome-inactivating proteins: Potent poisons and molecular tools. *Virulence*. 4: 774–784.

Wurpel, D., Totsika, M., Allsopp, L., Hartley-Tassell, L., Day, C., *et al.* **2014**. F9 Fimbriae of Uropathogenic *Escherichia coli* Are Expressed at Low Temperature and Recognise Gal β 1-3GlcNAc-Containing Glycans. *PLOS ONE*. 9(3): e93177.

Wijnsma, K., Schijvens, A., Rossen, J., Kooistra-Smid, A., Schreuder, M., van de Kar, N. **2017**. Unusual severe case of hemolytic uremic syndrome due to Shiga toxin 2d-producing *E. coli* O80:H2. *Pediatr. Nephrol. Berl. Ger.* 32: 1263–1268.

Wong, C., Jelacic, S., Habeeb, R., Watkins, S., Tarr, P. **2000**. The risk of the hemolytic-uremic syndrome after antibiotic treatment of *Escherichia coli* O157:H7 infections. *N. Engl. J. Med.* 342: 1930–1936.

Xicohtencatl, J., Monteiro, V., Ledesma, M., Jordan, D., Francetic, O., *et al.* **2007**. Intestinal adherence associated with type IV pili of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J Clin Invest.* 117: 3519–3529.

Yamamoto, D., Hernandez, R., Liberatore, A., Abe C., Souza R., Romão F., Sperandio, V., Koh, I., Gomes, T. **2017**. *Escherichia albertii*, a novel human enteropathogen, colonizes rat enterocytes and translocates to extra-intestinal sites. *PLoS ONE.* 12 (2): e0171385. doi:10.1371/journal.pone.0171385

Zamudio, J., Peña, M., Riesgo, J. **2012**. La ubiquitinación: un sistema de regulación dinámico de los organismos. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 15(2):133-141.

Zhang, X., McDaniel, A., Wolf, L., Keusch, G., Waldor, M., Acheson, D. **2000**. Quinolone antibiotics induce Shiga toxin-encoding bacteriophages, toxin production, and death in mice. *J Infect Dis.* 181(2): 664-670.

Difusión de resultados

Con respecto a la difusión de resultados obtenidos se han presentado dos trabajos titulados:

- PHENOTYPIC AND GENO-TYPIC CHARACTERIZATION OF SHIGA TOXIN PRODUCING *ESCHERICHIA COLI* (STEC) O157 STRAINS ISOLATED IN URUGUAY en el 10th International Symposium on Shiga Toxin (Verocytotoxin) Producing *Escherichia coli* Infections, realizado en mayo de **2018**, en Florencia, Italia.
- *ESCHERICHIA COLI* O111: NM UNA CAUSA POCO FRECUENTE DE SÍNDROME HEMOLÍTICO UREMICO EN LA REGIÓN en el 7 Congreso Internacional de Infectología Pediátrica y Vacunas realizado en Abril de **2018** en Uruguay.

Se realizará la presentación de un trabajo en el XXV Congreso Latinoamericano de Microbiología - ALAM 2021, cuyo resumen ya fue aceptado, el mismo se titula: "Caracterización de cultivos de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga (STEC) del serogrupo O157".

Con respecto a instancias de financiamiento he participado en el marco de esta tesis en la escritura y presentación de dos proyectos:

- Un Proyecto INNOVAGRO, financiado por la ANII (Proyecto FSA_I_2017_1_140224 denominado "**Prevalencia de *Escherichia coli* productor de Toxina Shiga (STEC) en canales bovinas uruguayas**"), es un proyecto interinstitucional, desarrollado entre INIA, LATU, MGAP, INAC y nuestro departamento de Bacteriología y Virología.
- Un proyecto financiado por CSIC 2018 titulado "**Estudio de asociación del genoma completo (GWAS) en *E. coli*: una aproximación original para la búsqueda de marcadores genéticos del patotipo productor de la toxina shiga (STEC)**".

Ambos proyectos aún están en ejecución, cumpliéndose los plazos establecidos hasta la fecha.

Publicación en revista arbitrada: “**¿Does Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and *Listeria monocytogenes* significantly contribute with the local burden of antimicrobial resistance?**”, *Frontiers Veterinary Science* (índice de impacto 2.245), de los autores María Inés Mota*, Sylvia Vazquez*, Cecilia Cornejo, Ana Caetano, Valeria Braga, Bruno D’Alessandro, Laura Betancor, Gustavo Varela, 7:583930. doi: 10.3389/fvets.2020.583930.

ANEXO I. Cebadores y condiciones de ciclado de las diferentes PCRs realizadas

Cebadores y condiciones utilizadas para la determinación de secuenciotipo de *E. coli*.

Genes	Cebadores	Secuencia 5'-3'	Tamaño (pb)	Mezcla de reacción (volumen final 25 µL)	Temperatura de annealing (°C)
<i>adk</i>	adk F	ATTCTGCTTGGCGCTCCGGG	583	0.2mM de dNTPs; 2.0 mM de MgCl ₂ , 0.5 µM de cada primer, 1X de buffer, 1.25 U de Taq Polimerasa (Fermentas); 2.5 µl de ADN	2 min a 95°C, (1 min a 95°C, 1 min a 54°C, 2 min a 72°C) x 30, extensión 5 min a 72°C.
	adk R	CCGTCAACTTTCGCGTATTT			
<i>fumC</i>	fumC F	TCACAGGTCGCCAGCGCTTC	806		
	fumC R	GTACGCAGCGAAAAAGATTC			
<i>gyrB</i>	gyrB F	TCGGCGACACGGATGACGGC	911		
	gyrB R	ATCAGGCCTTCACGCGCATC			
<i>lcd</i>	lcd F	ATGAAAAGTAAAGTAGTTGTCCGGCACA	878		
	lcd R	GGACGCAGCAGGATCTGTT			
<i>mdh</i>	mdh F	ATGAAAGTCGCAGTCTCGGCGCTGCTGGCGG	932		
	mdh R	TTAACGAACTCTGCCCCAGAGCGATATCTTTCTT			
<i>purA</i>	purA F	CGCGCTGATGAAAGAGATGA	816		
	purA R	CATACGGTAAGCCACGCAGA			
<i>recA</i>	recA F	CGCATTGCTTTACCCTGACC	780		
	recA R	TCGTGAAATCTACGGACCGGA			

Cebadores y condiciones utilizadas para las diferentes PCRs.

Genes	Cebadores	Secuencia 5'-3'	Tamaño (pb)	Mezcla de reacción (volumen final 25 µL)	Ciclado
<i>stx1</i>	VT1c VT1d	ACC CTG TAA CGA AGT TTG CG ATC TCA TGC GAC TAC TTG AC	130	0.4mM de dNTPs; 4.0 mM de MgCl ₂ , 1X de buffer, 1.25 U de Taq Polimerasa (Fermentas). Los cebadores VT1 y VT2 se usaron a una concentración de 0,6 µM y 0,15 µM, respectivamente. 2.5 µl de ADN	Desnaturalización inicial 95°C por 2 min, seguido de 30 ciclos de desnaturalización 95°C 60 s, annealing 57°C 30 s, elongación 72°C 30 s), elongación final 72°C 4 min.
<i>stx2</i>	LP43 LP44	ATC CTA TTC CCG GGA GTT TAC G GCG TCA TCG TAT ACA CAG GAG C	348		
<i>stx1a</i>	stx1a-F1: stx1a-R2:	CCTTCCAGGTACAACAGCGGTT GGAAACTCATCAGATGCCATTCTGG	478	0.2mM de dNTPs; 2.0 mM de MgCl ₂ , 0.4 µM de cada primer, 1X de buffer, 1.25 U de Taq Polimerasa (Fermentas); 2.5 µl de ADN	Desnaturalización inicial 95°C por 15 min, seguido de 30 ciclos de desnaturalización 94°C 50 s, annealing 63°C 40 s, elongación 72°C 1 min), elongación final 72°C 3 min.
<i>stx1c</i>	stx1c-F1: stx1c-R1:	CCTTTCCTGGTACAACGCGGTT CAAGTGTGTACGAAATCCCCTCTGA	252		
<i>stx1d</i>	stx1d-F1: stx1d-R2:	CAGTTAATGCGATTGCTAAGGAGTTTACC CTCTTCTGTTCTAACCCATGATA	203		
<i>stx2a</i>	stx2a-F2: stx2a-R3: stx2a-R2:	GCGATACTGRBACTGTGGCC CCGKCAACCTTCACTGTAATGTG GCCACCTTCACTGTGAATGTG	349 347		
<i>stx2b</i>	stx2b-F1: stx2b-R1:	AAATATGAAGAAGATATTTGTAGCGGC CAGCAAATCCTGAACCTGACG	251		
<i>stx2c</i>	stx2c-F1: stx2c-R2:	GAAAGTCACAGTTTTATATACAACGGGTA CCGGCCACYTTTACTGTGAATGTA	177		
<i>stx2d</i>	stx2d-F1: stx2d-R1:	AAARTCACAGTCTTATATACAACGGGTG TTYCCGGCCACTTTTACTGTG	179	Desnaturalización inicial 95°C por 10 min, seguido de 35 ciclos de	

					desnaturalización 94°C 50 s, annealing 68°C 40 s, elongación 72°C 1 min), elongación final 72°C 3 min.
<i>eae</i>	AE 9 AE 10 SK1 SK2	ACG TTO CAG CAT GGG TAA CTC GAT COGG CAA CAG TTT CAC CIO CCCGAATTCGGCACAAGCATAAGC CCCGGATCCGTCTGCCAGTATTCCG	815 863	0.2mM de dNTPs; 6.0 mM de MgCl ₂ , 0.4 µM de cada primer, 1X de buffer, 1.25 U de Taq Polimerasa (Fermentas); 2.5 µl de ADN	Desnaturalización inicial 95°C por 15 min, seguido de 35 ciclos de desnaturalización 94°C 60 s, annealing 58°C 40 s, elongación 72°C 2 min), elongación final 72°C 5 min.
<i>eae</i> γ 1	eae-FB eae-C1	AAAACCGCGGAGATGACTTC AGAACG/TCTGCTACTAGATGTC (O157 y O145 cambiando T por G)	804	0.2mM de dNTPs; 6.0 mM de MgCl ₂ , 0.4 µM de cada primer, 1X de buffer, 1.25 U de Taq Polimerasa (Fermentas); 2.5 µl de ADN	Desnaturalización inicial 95°C por 15 min, seguido de 30 ciclos de desnaturalización 94°C 50 s, annealing 58°C 40 s, elongación 72°C 1 min), elongación final 72°C 3 min.
<i>eae</i> β 1	eae B1-F eae B1-R	CGCCACTTAATGCCAGCG CTTGATACACCTGATGACTGT	811	0.2mM de dNTPs; 6.0 mM de MgCl ₂ , 0.4 µM de cada primer, 1X de buffer, 1.25 U de Taq Polimerasa (Fermentas); 2.5 µl de ADN	Desnaturalización inicial 95°C por 15 min, seguido de 30 ciclos de desnaturalización 94°C 50 s, annealing 58°C 40 s, elongación 72°C 1 min), elongación final 72°C 3 min.
<i>katP</i>	WKAT F WKAT B	AACTTA TTTCTCGCATCATCC CTTCTGTCTGATTCTTCTGG	2126	0.2mM de dNTPs; 2.0 mM de MgCl ₂ , 0.4 µM de cada primer, 1X de buffer, 1.25 U de Taq Polimerasa (Fermentas); 2.5 µl de ADN	Desnaturalización inicial 95°C por 5 min, seguido de 35 ciclos de desnaturalización 95°C 60 s, annealing 56°C 60 s, elongación 72°C 1 min), elongación final 72°C 10 min.
<i>espJ</i>	M-EspJf2 M-EspJr2	ATGTCAATTATAAAAACTGCTTATC TTTTTTGAGAGGATATATGTCAAC	650	0.1mM de dNTPs; 2.0 mM de MgCl ₂ , 1.1 µM de cada primer, 1X de buffer, 1.25 U de Taq Polimerasa (Fermentas); 2.5 µl de ADN	Desnaturalización inicial 95°C por 2 min, seguido de 30 ciclos de desnaturalización 94°C 60 s, annealing 53°C 40 s, elongación 72°C 1 min), elongación final 72°C 3 min
<i>espP</i>	ESP A ESP B	AAACAGCAGGCACTTGAACG GGAGTCGTCAGTCAGTAGAT	1830	0.2mM de dNTPs; 2.0 mM de MgCl ₂ , 0.4 µM de cada primer, 1X de buffer, 1.25 U de Taq Polimerasa (Fermentas); 2.5 µl de ADN	Desnaturalización inicial 94°C por 1 min, seguido de 30 ciclos de desnaturalización 94°C 60 s, annealing 56°C 60 s, elongación 72°C 90 s), elongación final 72°C 7 min
<i>tccP</i>	tccP-F1 tccP-R1	ATGATTAACAATGTTTCTTCACTT TCACGAGCGCTTAGATGTATTAATGCC	1000	0.2mM de dNTPs; 2.0 mM de MgCl ₂ , 0.4 µM de cada primer, 1X de buffer, 1.25 U de Taq Polimerasa (Fermentas); 2.5 µl de ADN	Desnaturalización inicial 94°C por 5 min, seguido de 30 ciclos de desnaturalización 94°C 60 s, annealing 53°C 60 s, elongación 72°C 1 min), elongación final 72°C 5 min.
<i>LpF</i>	LPFA2-CF LPFA2-CR	CTACAGGCGGCTGATGGAACA GCTAATACCAGCGGCAGCATCGT	297	0.2mM de dNTPs; 6.0 mM de MgCl ₂ , 0.4 µM de cada primer, 1X de buffer, 1.25 U de Taq Polimerasa (Fermentas); 2.5 µl de ADN	Desnaturalización inicial 95°C por 2 min, seguido de 30 ciclos de desnaturalización 94°C 60 s, annealing 55°C 40 s, elongación 72°C 1 min), elongación final 72°C 3 min.

<i>hcpA</i>	hcpA-F hcpA-R	TCGCTAGTTGCTGACAGATTT AATGCTGTGTGTGCGACTG	900- 1000	0.2mM de dNTPs; 6.0 mM de MgCl ₂ , 0.4 μM de cada primer, 1X de buffer, 1.25 U de Taq Polimerasa (Fermentas); 2.5 μl de ADN	Desnaturalización inicial 95°C por 2 min, seguido de 30 ciclos de desnaturalización 94°C 60 s, annealing 55°C 40 s, elongación 72°C 1 min), elongación final 72°C 3 min.
<i>F9</i>	2591 2592	GGCATATCGTATGCATCAGGTG GCCAACTACCAATGTTGATGCC	600-700	0.2mM de dNTPs; 6.0 mM de MgCl ₂ , 0.4 μM de cada primer, 1X de buffer, 1.25 U de Taq Polimerasa (Fermentas); 2.5 μl de ADN	Desnaturalización inicial 95°C por 2 min, seguido de 30 ciclos de desnaturalización 94°C 60 s, annealing 55°C 40 s, elongación 72°C 1 min), elongación final 72°C 3 min.
<i>Iha</i>	iha-I iha-II	CAGTTCAGTTTCGCATTCACC GTATGGCTCTGATGCGATG	1300	0.2mM de dNTPs; 6.0 mM de MgCl ₂ , 0.4 μM de cada primer, 1X de buffer, 1.25 U de Taq Polimerasa (Fermentas); 2.5 μl de ADN	Desnaturalización inicial 95°C por 2 min, seguido de 30 ciclos de desnaturalización 94°C 30 s, annealing 56°C 60 s, elongación 72°C 90 s), elongación final 72°C 3 min.
Caldos posición 539, 438, 1060 y 630		Ver tabla 4	----	El volumen final en esta técnica es de 20 uL, Master Mix 1X (Kapabiosystems), primer F y R 0.5 μM, 2.0 μl de ADN	Etapa 1: Activación de la enzima y pegado de primers 95°C 10 min y 70°C 30 s. Etapa 2: Son 10 ciclos de extension donde se va bajando la temperature de 69°C de a 1°C por ciclo (72°C 30s, 95°C 20 s, 69°C 30 s). Etapa 3: Adquisición 40 ciclos de 72°C 30 s, 95°C 20 s, 60°C 30s.
Sitios de inserción de LEE <i>PheU</i>	pheU_for (no. 7) pheU_rev (no. 11)	TTCACCCACGAACGTGTAACC AAATCTCATCAGTCGCCGTTT	664	0.2mM de dNTPs; 2.0 mM de MgCl ₂ , 0.4 μM de cada primer, 1X de buffer, 1.25 U de Taq Polimerasa (Fermentas); 2.5 μl de ADN	Desnaturalización inicial 95°C por 5 min, seguido de 30 ciclos de desnaturalización 94°C 90 s, annealing 55°C a 60°C 90 s, elongación 72°C 2 min), elongación final 72°C 5 min.
Sitios de inserción de LEE <i>PheV</i>	pheV_for (no. 1) pheV_rev (no. 6)	ACTTACC GCATGAGCAGTAA GTGCAGCGGCTGGAGTTTGGA	1300		
Sitios de inserción de LEE <i>SeIC</i>	K260_for K259_rev	CGCCGATTTTTCTTAGCCCA CGCCGATTTTTCTTAGCCCA	2000		

ANEXO II. Resultados obtenidos en las cepas de referencia/colección

Detección de *stx1* y *stx2* y sus variantes por PCR

Distribución de los genes de virulencia *stx1*, *stx2* en las cepas de referencia analizadas y sus variantes. (nd: no determinado).

AISLAMIENTO	ORIGEN	SEROTIPO	VARIANTES STX1	VARIANTES STX2
35	control interlaboratorio	O157:H7	A 933J/C	A/C
59	MALBRAN cepa colección	O145	---	A/D
62	UNAM 2015 cepa colección	O145	---	A
63	UNAM cepa de colección	O26:H11	A 933J/C	A/D
64	UNAM cepa de colección	O103 H2	---	A/D
65	UNAM cepa colección	O111 :H8	A 933J/C	A
66	UNAM cepa colección	O121:H19	---	nd

Detección del gen *eae* y sus variantes

Distribución en las cepas de referencia del gen de virulencia *eae* y sus variantes asociadas al serotipo O157 y no-O157. Se informan los porcentajes correspondientes en relación al total de aislamientos por grupo.

AISLAMIENTO	ORIGEN	SEROTIPO	<i>eae</i>	VARIANTE <i>eae</i> Y1	VARIANTE <i>eae</i> B1
22	ND	O157:H7	-	-	-
35	control interlaboratorio	O157:H7	+	+	-
59	MALBRAN cepa colección	O145	+	+	-
62	UNAM 2015 cepa colección	O145	+	+	-
63	UNAM cepa de colección	O26:H11	+	-	+
64	UNAM cepa de colección	O103 H2	+	-	-
65	UNAM cepa colección	O111 :H8	+	-	-
66	UNAM cepa colección	O121:H19	+	-	-

Detección de genes asociados con la virulencia

Distribución de los genes de factores responsables de virulencia adicionales a los típicos de STEC en cepas de referencia.

Aislamiento	Origen	Serotipo	LPF	hcpA	iha	F9	tccP	espJ	katP	espP
35	control interlaboratorio	O157:H7	+	+	+	+	+	+	+	-
59	MALBRAN cepa colección	O145	+	+	+	+	-	-	+	-
62	UNAM 2015 cepa colección	O145	+	+	+	+	-	-	-	+
63	UNAM cepa de colección	O26:H11	-	-	+	+	-	-	-	-
64	UNAM cepa de colección	O103 H2	+	+	-	+	-	+	-	-
65	UNAM cepa colección	O111 :H8	-	-	+	+	-	-	-	-
66	UNAM cepa colección	O121:H19	-	-	-	+	-	-	-	-

Sitios de inserción de la isla de patogenicidad LEE

Presencia/Ausencia de los productos de PCR para los sitios de inserción de la Isla de patogenicidad LEE, *pheU*, *selC* y *pheV*, en las cepas de referencia.

AISLAMIENTOS	ORIGEN	SEROTIPO	SITIO PHEU	SITIO SELC	SITIO PHEV
22	ND	O157:H7	-	-	-
35	control interlaboratorio	O157:H7	+	-	+
59	MALBRAN cepa colección	O145	-	-	-
62	UNAM 2015 cepa colección	O145	-	-	-
63	UNAM cepa de colección	O26:H11	-	+	-
64	UNAM cepa de colección	O103 H2	-	+	-
65	UNAM cepa colección	O111 :H8	-	+	-
66	UNAM cepa colección	O121:H19	-	+	+
K12 CONTROL SITIO NO OCUPADO	ATCC		+	+	+

Estudios de susceptibilidad/resistencia a antimicrobianos

Perfiles de sensibilidad/resistencia de los aislamientos locales estudiados.

CÓDIGO AISLAMIENTO	AMOXICILINA ACIDO CLAVULÁNICO	CEFOTAZIDIME (CAZ)	CEFOXITINA (FOX)	FOSFOMICINA - TROMETAMOL (FOT)	CEFUROXIME (CXM)	CEFTRIAXONA (CRO)	CEFEPIME (FEP)	GENTAMICINA (CN)	TRIMETROPIM SULFAMETOXA ZOL (SXT)	MEROPENEM (MEM)	IMPENEM (IPM)	CIPROFLOXACINA (CIP)	AMPICILINA (AMP)	AMICACINA (AK)
22	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
35	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
59	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
62	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
63	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
64	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

65	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
66	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

Anexo III. Diámetros de referencia para los antibióticos ensayados

	Diámetros de referencia			
	CARGA	RESISTENTE < o = (mm)	INTERMEDIO (mm)	SENSIBLE > o = (mm)
Amoxicilina Acido Clavulánico (AMC)	10 µg	13	14-17	18
Ceftazidime (CAZ)	30 µg	17	18-20	21
Cefoxitin (FOX)	30 µg	14	15-17	18
Fosfomicina – trometamol (FOT)	50 ug	12	13-14	15
Cefuroxime (CXM)	30 µg	14	15-17	18
Ceftriaxona (CRO)	30 µg	19	20-22	23
Cefepime (FEP)	30 µg	18	19-24	25
Gentamicina (CN)	10 ug	12	13-14	15
Trimetropim sulfametoxazol (SXT)	1.25/ 23.75 µg	10	11 15	16
Meropenem (MEM)	10 ug	19	20-22	23
Ciprofloxacina Imipenem (IPM)	10 ug	19	20-22	23
(CIP)	5 ug	15	16-20	21
Ampicilina (AMP)	10 µg	13	14-16	17
Amicacina (AK)	30 µg	14	15-16	17

Anexo IV. Genes candidatos a estar relacionados con las cepas STEC, función potencial y evaluación como marcador molecular

Código del Gen	Total Score*	Query cover **	E value***	Identidad	Función Potencial
zzzz.10094	86.7	100%	1,00E-21	98%	T3SS effector NleB [<i>Escherichia coli</i>]
zzzz.10095	957	100%	0.0	100.0%	Subunidad de un transportador de alfa hemolisina
zzzz.10189	335	100%	4,00E-116	100.0%	T3SS effector EspY2 [<i>Escherichia coli</i>]
zzzz.10236	122	100%	5,00E-35	100.0%	Proteína hipotética de <i>E. coli</i>
zzzz.10238	211	100%	4,00E-69	99.0%	Proteína de unión al ADN
zzzz.10239	212	100%	2,00E-69	100%	Proteína hipotética
zzzz.10297	299	100%	3,00E-102	100%	Proteína EspF, tccp2 de <i>E. coli</i>
zzzz.10585	608	100%	0.0	100%	NleH1-1 quinasa efectora por el sistema de secreción tipo III (<i>E. coli</i>).
zzzz.10586	221	100%	2,00E-72	100%	Proteína de sistema de transferencia conjugativa tipo F TrbI [<i>Escherichia coli</i>]
zzzz.10683	480	100%	3,00E-171	100%	Proteína hipotética, posible proteína de membrana (<i>E. coli</i>)
zzzz.10685	213	100%	4,00E-70	100%	Proteína hipotética de Enterobacterias
zzzz.10690	214	100%	2,00E-70	99%	Proteína hipotética de <i>E. coli</i>
zzzz.10691	958	100%	0.0	100%	Proteína de transferencia de ADN de fagos (aciltransferasa, <i>E. coli</i>)
zzzz.10989	191	100%	2,00E-61	100%	Homólogo a EspO, efector secretado por T3SS (<i>E. albertii</i>)
zzzz.10990	191	100%	2,00E-61	100%	Homólogo a EspO, efector secretado por T3SS (<i>E. coli</i>)
zzzz.10991	187	97%	7,00E-60	100%	Proteína de secreción EspO [<i>Escherichia coli</i>]
zzzz.10992	360	100%	6,00E-126	100%	Proteína hipotética de Enterobacterias
zzzz.11094	1266	100%	0.0	100%	Proteína hipotética de Enterobacterias
zzzz.11137	659	100%	0.0	100%	Toxina Shiga Stx2c subunidad A [<i>Escherichia coli</i>]
zzzz.11138	107	100%	2,00E-29	100%	Proteína hipotética D4M50_02660 [<i>Escherichia coli</i>]
zzzz.11217	830	100%	0.0	100%	MULTISPECIES: proteína que contiene el dominio DUF4236 [Gammaproteobacteria]
zzzz.11218	759	100%	0.0	100%	Biosíntesis de salmochelin C-glicosiltransferasa IroB [<i>Escherichia coli</i>]
zzzz.11329	222	100%	4,00E-73	100%	Proteína hipotética ECSTEC7V_1877 [<i>Escherichia coli</i> STEC_7v]

zzzz.11330	165	100%	2,00E-51	100%	Proteína desconocida codificada dentro del prophage CP-9330 [<i>Escherichia coli</i> O157: H7 str. EDL933]
zzzz.11331	168	100%	1e-52	100%	Proteína de unión al ADN de la familia Arc [<i>Escherichia coli</i>]
zzzz.11478	345	100%	3e-120	99%	Regulador transcripcional de la familia Fis [<i>Escherichia coli</i>]
Zzzz.11581	655	100%	0.0	99%	HpcH / HpaI proteína de la familia aldolasa / citrato liasa [<i>Escherichia coli</i>]
zzzz.11582	785	100%	0.0	100%	MULTISPECIES: adenina / guanina fosforibosiltransferasa [<i>Enterobacteriaceae</i>]
zzzz.11583	781	100%	0.0	100%	MULTISPECIES: adenina / guanina fosforibosiltransferasa [<i>Enterobacteriaceae</i>]
zzzz.11584	118	100%	1,00E-033	100%	Posible transposasa, insO para la secuencia de inserción IS911B
zzzz.11600	533	100%	0.0	100%	Familia de manosil-3-fosfoglicerato fosfatasa [<i>Escherichia coli</i>]
zzzz.11601	153	100%	4,00E-047	100%	Regulador transcripcional de la familia Cro / Cl [<i>Escherichia coli</i>]
zzzz.11633	310	100%	8,00E-107	100%	MULTISPECIES: proteína de resistencia al telurio TerW [<i>Escherichia</i>]
zzzz.11634	731	100%	0.0	100%	MULTISPECIES: cisteína proteasa de la familia proteica Stp [<i>Enterobacteriaceae</i>]
zzzz.11711	933	100%	0.0	100%	Efactor del sistema de secreción tipo III EspK [<i>Escherichia coli</i>]
zzzz.11712	933	100%	0.0	100%	Efactor del sistema de secreción tipo III EspK, Gob [<i>Escherichia coli</i>]
zzzz.11713	388	100%	2,00E-136	100%	Proteasa de la proa del fago HK97 [<i>Escherichia coli</i>]
zzzz.11952	119	100%	4,00E-034	100%	Proteína hipotética (<i>E. coli</i>)
zzzz.12069	825	100%	0.0	100%	Efactor EspG del sistema de secreción tipo III LEE [<i>Escherichia coli</i>]
zzzz.12070	105	73%	4,00E-028	85%	Producto proteico sin nombre
zzzz.12089	777	100%	0.0	100%	Proteína de la familia 4 de glicosiltransferasa [<i>Escherichia coli</i>]
zzzz.12104	905	100%	0.0	100%	Efactor del sistema de secreción tipo III NleA [<i>Escherichia coli</i>]
zzzz.12105	136	100%	1,00E-040	100%	Proteína hipotética (<i>E. coli</i>)
zzzz.12108	147	100%	9,00E-045	100%	MULTISPECIES: aguja subunidad principal EscF del sistema de secreción tipo III LEE [<i>Enterobacteriaceae</i>]
zzzz.12109	281	100%	6,00E-096	100%	Chaperona CesD2 del sistema de secreción tipo III LEE [<i>Escherichia coli</i>]
zzzz.12110	615	100%	0.0	100%	Sistema de secreción tipo III LEE translocon subunidad formadora de poros EspB [<i>Escherichia coli</i>]
zzzz.12112	380	100%	5,00E-133	100%	MULTISPECIES: sistema de secreción tipo III LEE translocon filamento de proteína EspA [<i>Escherichia</i>]
zzzz.12113	696	100%	0.0	100%	Sistema de secreción tipo III LEE gatekeeper SepL [<i>Escherichia coli</i>]
zzzz.12114	822	100%	0.0	100%	MULTISPECIES: sistema de secreción tipo III LEE proteína de anillo de membrana interna EscD [<i>Enterobacteriaceae</i>]
zzzz.12115	319	100%	4,00E-110	100%	MULTISPECIES: sistema de secreción tipo III LEE chaperona CesT [<i>Enterobacteriaceae</i>]
zzzz.12116	258	100%	3,00E-087	100%	Sistema de secreción tipo III LEE chaperona CesF [<i>Escherichia coli</i>]
zzzz.12117	632	100%	0.0	100%	Sistema de secreción tipo III LEE proteína del anillo EscQ [<i>Escherichia coli</i>]
zzzz.12118	246	100%	2,00E-082	100%	Sistema de secreción tipo III Regulador positivo de actividad LEE ATPasa EscO [<i>Escherichia coli</i>]
zzzz.12119	188	100%	4,00E-060	100%	MULTISPECIES: sistema de secreción tipo III LEE efector citoprotector EspZ [<i>Enterobacteriaceae</i>]

zzzz.12120	190	100%	7e-61	100%	Proteína SepZ [<i>Escherichia coli</i>]
zzzz.12121	186	100%	1,00E-059	100%	Proteína de sistema de secreción tipo III SepZ [<i>Escherichia coli</i>]
zzzz.12124	317	100%	1,00E-109	100%	Sistema de secreción tipo III LEE proteína de cambio SepD [<i>Escherichia coli</i>]
zzzz.12125	314	100%	2,00E-108	100%	MULTISPECIES: sistema de secreción tipo III LEE chaperona CesD [<i>Enterobacteriaceae</i>]
zzzz.12126	280	100%	3,00E-095	100%	Sistema de secreción tipo III LEE regulador transcripcional GrlA [<i>Escherichia coli</i>]
zzzz.12157	1089	100%	0.0	100%	Receptor de intimina translocado Tir sistema de secreción tipo III LEE [<i>Escherichia coli</i>]
zzzz.12158	1136	100%	0.0	100%	Receptor de intimina translocado Tir sistema de secreción tipo III LEE [<i>Escherichia coli</i>]
zzzz.12159	1108	100%	0.0	100%	Receptor de intimina translocado Tir sistema de secreción tipo III LEE [<i>Escherichia coli</i>]
zzzz.12160	1079	100%	0.0	100%	Receptor de intimina translocado Tir sistema de secreción tipo III LEE [<i>Escherichia coli</i>]
zzzz.12161	283	100%	2,00E-096	99%	MULTISPECIES: sistema de secreción tipo III LEE regulador de longitud de aguja EspP [<i>Enterobacteriaceae</i>]
zzzz.12162	233	100%	3,00E-077	100%	MULTISPECIES: sistema de secreción tipo III LEE chaperona CesL [<i>Enterobacteriaceae</i>]
zzzz.12163	349	100%	1,00E-121	100%	MULTISPECIES: proteína inhibidora de la nucleasa del huésped Gam [<i>Enterobacteriaceae</i>]
zzzz.12236	659	100%	0.0	100%	proteína de la familia LpxR deacilasa de lípido A [<i>Escherichia coli</i>]
zzzz.12237	149	100%	2,00E-045	100%	Proteína hipotética C6981_12205 [<i>Escherichia coli</i>]
zzzz.12241	349	100%	1e-121	100%	Proteína efectora T3SS EspH [<i>Escherichia coli</i>]
zzzz.12242	104	100%	3,00E-028	100%	Proteína hipotética [<i>Escherichia coli</i>]
zzzz.13259	587	100%	0.0	100%	Proteína que contiene el dominio dicluster 4Fe-4S [<i>Escherichia coli</i>]
zzzz.13318	272	100%	2,00E-92	100%	Proteína fimbrial [<i>Escherichia coli</i>]
zzzz.13393	395	100%	5,00E-139	100%	MULTISPECIES: proteína de transferencia conyugal TraX [<i>Enterobacteriaceae</i>]
zzzz.13939	879	100%	0.0	100%	Proteína hipotética BSG22_14095 [<i>Escherichia coli</i>]
zzzz.14054	109	90%	3,00E-30	100%	Proteína hipotética EC40967_C0074 [<i>Escherichia coli</i> 4.0967]
zzzz.15401	99.0	100%	3,00E-26	100%	MULTISPECIES: proteína que contiene el dominio DUF2740 [<i>Enterobacteriaceae</i>]
zzzz.15545	86.3	100%	3,00E-21	100%	DNasa [<i>Escherichia coli</i>]
zzzz.16397	182	100%	3,00E-58	100%	Proteína hipotética [<i>Escherichia coli</i>]
zzzz.18008	314	100%	2,00E-108	100%	MULTISPECIES: inhibidor de la división celular del huésped Proteína similar a Icd [<i>Enterobacteriaceae</i>]
zzzz.18520	237	100%	6,00E-79	100%	Proteína hipotética [<i>Escherichia coli</i>]
zzzz.20260	1143	100%	0.0	99%	ATPasa de la familia AAA [<i>Escherichia coli</i>]
zzzz.21278					No blastea con nada
zzzz.21761	145	100%	7,00E-44	100%	Proteína hipotética [<i>Escherichia coli</i>]
zzzz.22486	150	100%	7,00E-46	100%	Proteína hipotética BCV59_04185 [<i>Escherichia coli</i>]
zzzz.22528	754	100%	0.0	100%	Subunidad de endonucleasa de restricción tipo II R [<i>Escherichia coli</i>]
zzzz.22657	312	100%	2,00E-107	100%	Proteína hipotética BvCmsNSP002_04775 [<i>Escherichia coli</i>]
zzzz.3268	159	100%	4,00E-49	100%	Proteína de dominio conservado [<i>Escherichia coli</i> E22] y proteína DinI en <i>Enterobacterias</i>
zzzz.3396	778	100%	1,00E-136	100%	Proteína que contiene el dominio DUF1076 [<i>Escherichia coli</i>]
zzzz.3397	236	100%	2,00E-77	100%	Proteína que contiene el dominio DUF1076 [<i>Escherichia coli</i>]

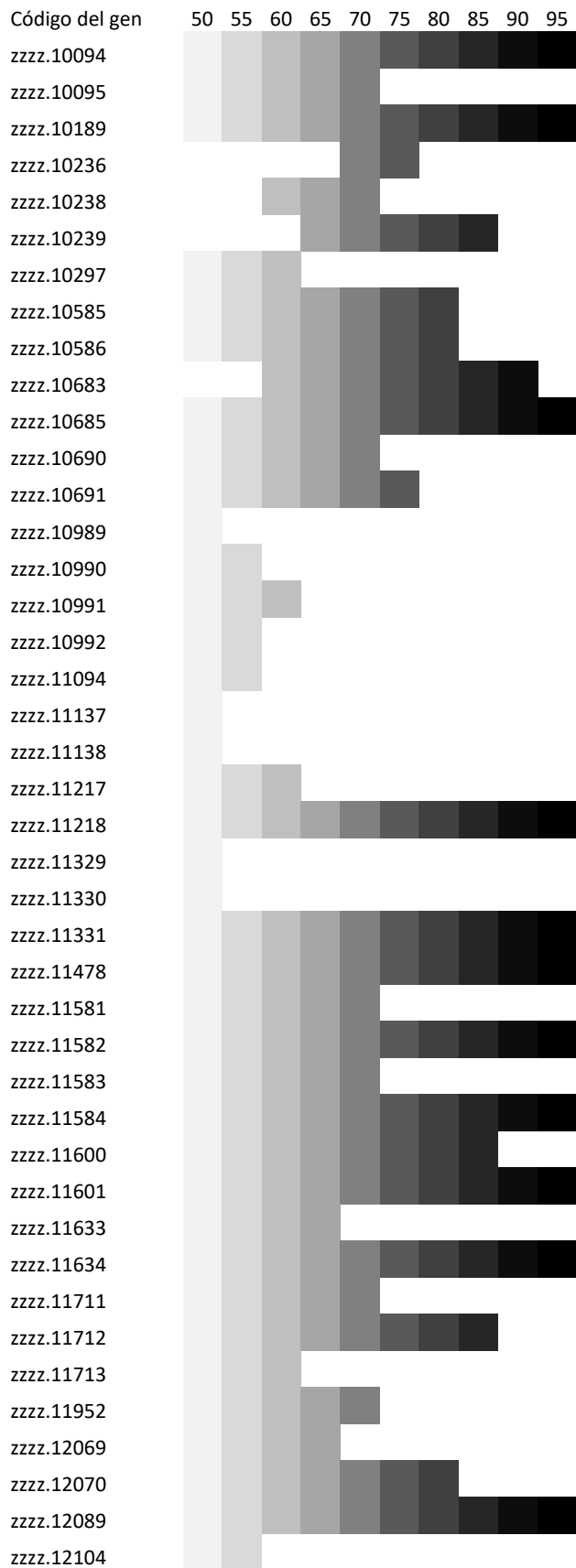
zzzz.3398	388	100%	2,00E-136	100%	Proteína que contiene el dominio DUF1076 [<i>Escherichia coli</i>]
zzzz.3399	288	100%	2,00E-97	100%	Efactor T3SS NleG [<i>Escherichia coli</i>]
zzzz.3401	262	100%	2,00E-88	100%	Proteína hipotética [<i>Escherichia coli</i>]
zzzz.3403	439	100%	1,00E-155	100%	Proteína que contiene el dominio DUF1076 [<i>Escherichia coli</i>]
zzzz.3404	441	100%	2,00E-156	100%	T3SS efector E3 ubiquitina-proteína ligasa NleG [<i>Escherichia coli</i>]
zzzz.3405	449	1	0%	100%	MULTISPECIES: proteína que contiene el dominio DUF1076 [<i>Escherichia</i>]
zzzz.3406	427	100%	2,00E-151	100%	Proteína que contiene el dominio DUF1076 [<i>Escherichia coli</i>]
zzzz.3529	433	100%	2,00E-153	100%	MULTISPECIES: aparato de exportación del sistema de secreción tipo III proteína SpaP [<i>Enterobacteriaceae</i>]
zzzz.3777	380	100%	3,00E-133	100%	MULTISPECIES: proteína de exportación de polisacáridos [<i>Enterobacteriaceae</i>]
zzzz.4008	645	100%	0.0	100%	Proteína antirrepresora [<i>Escherichia coli</i> O55: H7 str. CB9615]
zzzz.4407	1136	100%	0.0	100%	MULTISPECIES: sistema de secreción tipo III secretina MxiD [<i>Enterobacteriaceae</i>]
zzzz.4513	169	100%	4,00E-53	100%	MULTISPECIES: proteína de sistema de secreción flagelar tipo III FliQ [<i>Enterobacteriaceae</i>]
zzzz.4655	388	100%	3,00E-136	100%	MULTISPECIES: proteína de la familia TerD [<i>Escherichia</i>]
zzzz.4656	773	100%	0.0	100%	Proteína de dominio de resistencia a telurio [<i>Escherichia coli</i>]
zzzz.4658	790	100%	0.0	100%	MULTISPECIES: proteína de resistencia al telurio TerA [<i>Escherichia</i>]
zzzz.4659	851	100%	0.0	100%	no blastea con <i>E. coli</i>
zzzz.4664	394	100%	1,00E-138	100%	MULTISPECIES: proteína de resistencia al telurio TerZ [<i>Enterobacteriaceae</i>]
zzzz.4665	1035	100%	0.0	100%	Subunidad grande de terminase [<i>Escherichia coli</i>]
zzzz.4753	637	100%	0.0	100%	MULTISPECIES: Proteína de membrana de la familia TerC Alx [<i>Enterobacteriaceae</i>]
	636	100%	0.0	99%	Proteína de membrana de la familia TerC Alx [<i>Escherichia coli</i>]
zzzz.4945	160	100%	1,00E-49	100%	Proteína hipotética [<i>Escherichia coli</i>]
zzzz.5072	446	100%	1,00E-73	100%	Regulador transcripcional de la familia PerC [<i>Escherichia coli</i>]
zzzz.5616	133	100%	1,00E-39	100%	MULTISPECIES: proteína hipotética [<i>Enterobacteriaceae</i>]
zzzz.6906	103	98%	4,00E-28	100%	Proteína que contiene el dominio DUF3927 [<i>Escherichia coli</i>]
zzzz.8511	95.5	100%	6,00E-25	100%	MULTISPECIES: proteína de la familia YlcG [<i>Escherichia</i>]
zzzz.8599	300	100%	5,00E-103	99%	MULTISPECIES: proteína de membrana de resistencia al telurio TerB [<i>Enterobacteriaceae</i>]
zzzz.8600	286	100%	7,00E-98	100%	Proteína de resistencia a telurita / colicina [<i>Escherichia coli</i>]
zzzz.8605	200	100%	7,00E-65	100%	Proteína degradante 2 autoinductora LsrG [<i>Escherichia coli</i> MS 116-1]
zzzz.9098	123	100%	1,00E-35	100%	Proteína de la familia DUF1378 [<i>Escherichia coli</i>]
zzzz.9099	394	100%	5,00E-139	100%	Proteína Gp2 de tipo inovirus [<i>Escherichia coli</i>]
zzzz.9206	137	100%	2,00E-40	100%	Proteína hipotética BFD31_25665 [<i>Escherichia coli</i>]
zzzz.9437	496	100%	8,00E-177	100%	MULTISPECIES: aparato de exportación del sistema de secreción tipo III proteína SpaR [<i>Enterobacteriaceae</i>]
zzzz.9584	333	100%	2,00E-115	100%	MULTISPECIES: familia GNAT N-acetiltransferasa [<i>Escherichia</i>]
zzzz.9832	383	100%	2,00E-134	100%	MULTISPECIES: proteína hipotética [<i>Enterobacteriaceae</i>]
zzzz.9836	406	100%	2,00E-143	100%	Factor de intercambio de nucleótidos de guanina efector T3SS EspM1 [<i>Escherichia coli</i>]

zzzz.9837	407	100%	2,00E-143	100%	Chaperona regulada por bfpT [<i>Escherichia coli</i>]
zzzz.9838	205	100%	6,00E-67	100%	Regulador transcripcional de la familia PbsX [<i>Escherichia coli</i>]
zzzz.9968	130	100%	2,00E-38	100%	Proteína de la familia DUF1187 [<i>Escherichia coli</i>]

*Puntaje total asignado del resultado del blast. **Cobertura de la secuencia utilizada como punto de partida para la búsqueda (*query*).

***Valor E (estadístico que indica la probabilidad de que la similitud encontrada se deba al azar).

ANEXO V. Valores de identidad en los que aparecen los genes candidatos







ANEXO VI. Genes de Resistencia adquirida (datos obtenidos en ResFinder)

Antimicrobiano	Clase	Fenotipo predicho por WGS									
		<i>E. coli</i> 2	<i>E. coli</i> 4	<i>E. coli</i> 24	<i>E. coli</i> 29	<i>E. coli</i> 50	<i>E. coli</i> 52	<i>E. coli</i> 53	<i>E. coli</i> 60	<i>E. coli</i> 61	<i>E. coli</i> 69
spectinomycin	aminocyclitol	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia
amikacin	aminoglicoside	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia
apramycin	aminoglicoside	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia
arbekacin	aminoglicoside	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia
astromicin	aminoglicoside	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia
butiromycin	aminoglicoside	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia
butirosin	aminoglicoside	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia
dibekacin	aminoglicoside	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia
fortimicin	aminoglicoside	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia
gentamicin	aminoglicoside	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia
hygromycin	aminoglicoside	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia
isepamicin	aminoglicoside	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia
kanamycin	aminoglicoside	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	Resistencia
kasugamycin	aminoglicoside	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia
lividomycin	aminoglicoside	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	Resistencia
neomycin	aminoglicoside	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	Resistencia
netilmicin	aminoglicoside	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia
paromomycin	aminoglicoside	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	Resistencia
ribostamycin	aminoglicoside	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	Resistencia
sisomicin	aminoglicoside	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia
streptomycin	aminoglicoside	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	Resistencia
tobramycin	aminoglicoside	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia

nalidixic acid	fluoroquinolone	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia
sulfamethoxazole	folate pathway antagonist	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia
trimethoprim	folate pathway antagonist	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia
fosfomicin	fosfomicin	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	Resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia
teicoplanin	glycopeptide	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia
vancomycin	glycopeptide	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia
clindamycin	lincosamide	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia
lincomycin	lincosamide	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia
azithromycin	macrolide	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia
carbomycin	macrolide	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia
erythromycin	macrolide	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia
oleandomycin	macrolide	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia
spiramycin	macrolide	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia
telithromycin	macrolide	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia
tylosin	macrolide	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia
metronidazole	nitroimidazole	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia
linezolid	oxazolidinone	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia
chloramphenicol	phenicol	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia
florfenicol	phenicol	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia
tiamulin	pleuromutilin	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia
colistin	polymyxin	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia
mupirocin	pseudomonic acid	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia
rifampicin	rifamycin	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia
fusidic acid	steroid antibacterial	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia
dalfopristin	streptogramina	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia
pristinamycin iia	streptogramina	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia

quinupristin+dalfopristin	streptogramin a	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia
virginiamycin m	streptogramin a	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia
pristinamycin ia	streptogramin b	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia
quinupristin	streptogramin b	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia
virginiamycin s	streptogramin b	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia
doxycycline	tetracycline	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia
minocycline	tetracycline	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia
tetracycline	tetracycline	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia
tigecycline	tetracycline	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia
fluoroquinolone	under_development	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia	No resistencia

ANEXO VII. Genes que podrían conferir resistencia en los 10 genomas secuenciados (datos obtenidos de CARD)

E. coli 2				
RGI criteria	ARO term	Resistance Mechanism	% identity of matching region	% length of reference sequences
Strict	<i>mdtM</i>	antibiotic efflux	98.05	100.00
Strict	<i>CRP</i>	antibiotic efflux	99.52	100.00
Strict	<i>YojI</i>	antibiotic efflux	99.45	100.00
Strict	<i>PmrF</i>	antibiotic target alteration	99.38	100.00
Strict	<i>acrB</i>	antibiotic efflux	99.81	100.00
Strict	<i>emrY</i>	antibiotic efflux	99.22	100.00
Strict	<i>evgS</i>	antibiotic efflux	97.83	100.00
Strict	<i>Escherichia coli ampC1 beta-lactamase</i>	antibiotic inactivation	98.16	100.00
Strict	<i>acrD</i>	antibiotic efflux	99.81	100.00
Strict	<i>Escherichia coli ampC beta-lactamase</i>	antibiotic inactivation	97.08	100.00
Strict	<i>mdtN</i>	antibiotic efflux	99.42	100.00
Strict	<i>mdtO</i>	antibiotic efflux	98.83	100.00
Strict	<i>mdtP</i>	antibiotic efflux	97.95	100.00
Strict	<i>emrA</i>	antibiotic efflux	99.49	100.00
Strict	<i>rsmA</i>	antibiotic efflux	85.25	100.00
Strict	<i>Escherichia coli mdfA</i>	antibiotic efflux	97.07	100.00
Strict	<i>kdpE</i>	antibiotic efflux	98.67	100.00
Strict	<i>AcrE</i>	antibiotic efflux	99.74	100.00
Strict	<i>ugd</i>	antibiotic target alteration	99.23	100.00
Strict	<i>mdtA</i>	antibiotic efflux	99.04	100.00
Strict	<i>mdtB</i>	antibiotic efflux	99.62	100.00
Strict	<i>mdtC</i>	antibiotic efflux	99.41	100.00
Strict	<i>baeS</i>	antibiotic efflux	99.36	100.00
Strict	<i>baeR</i>	antibiotic efflux	99.58	100.00
Strict	<i>TolC</i>	antibiotic efflux	99.8	99.60
Strict	<i>Klebsiella pneumoniae KpnE</i>	antibiotic efflux	82.2	100.83
Strict	<i>Klebsiella pneumoniae KpnF</i>	antibiotic efflux	84.4	100.00
Strict	<i>mdtH</i>	antibiotic efflux	99.75	100.00
Strict	<i>Escherichia coli emrE</i>	antibiotic efflux	98.18	100.00
Strict	<i>Haemophilus influenzae PBP3 conferring resistance to beta-lactam antibiotics</i>	antibiotic target alteration	53.11	96.39
Strict	<i>Escherichia coli GlpT with mutation conferring resistance to fosfomycin</i>	antibiotic target alteration	99.12	100.00
Strict	<i>Escherichia coli EF-Tu mutants conferring resistance to Pulvomycin</i>	antibiotic target alteration	100.0	44.74
Strict	<i>Escherichia coli EF-Tu mutants conferring resistance to Pulvomycin</i>	antibiotic target alteration	100.0	23.23
Strict	<i>Escherichia coli EF-Tu mutants conferring resistance to Pulvomycin</i>	antibiotic target alteration	100.0	23.23
Strict	<i>Escherichia coli acrR with mutation conferring multidrug antibiotic resistance</i>	antibiotic target alteration, antibiotic efflux	100.0	100.00
Strict	<i>Escherichia coli soxR with mutation conferring antibiotic resistance</i>	antibiotic target alteration, antibiotic efflux	100.0	100.00
Strict	<i>Escherichia coli soxS with mutation conferring antibiotic resistance</i>	antibiotic target alteration, antibiotic efflux, reduced permeability to antibiotic	100.0	100.00
Strict	<i>Escherichia coli marR mutant conferring antibiotic resistance</i>	antibiotic target alteration, antibiotic efflux	98.61	100.00
Perfect	<i>Escherichia coli ampH beta-lactamase</i>	antibiotic inactivation	100.0	100.00

Perfect	<i>Escherichia coli acrA</i>	antibiotic efflux	100.0	100.00
Perfect	<i>emrK</i>	antibiotic efflux	100.0	110.26
Perfect	<i>evgA</i>	antibiotic efflux	100.0	100.00
Perfect	<i>eptA</i>	antibiotic target alteration	100.0	100.00
Perfect	<i>emrR</i>	antibiotic efflux	100.0	100.00
Perfect	<i>emrB</i>	antibiotic efflux	100.0	100.00
Perfect	<i>AcrS</i>	antibiotic efflux	100.0	100.00
Perfect	<i>marA</i>	antibiotic efflux, reduced permeability to antibiotic	100.0	100.00
Perfect	<i>msbA</i>	antibiotic efflux	100.0	100.00
Perfect	<i>bacA</i>	antibiotic target alteration	100.0	100.00
Perfect	<i>cpxA</i>	antibiotic efflux	100.0	100.00
Perfect	<i>H-NS</i>	antibiotic efflux	100.0	100.00
<i>E coli 4</i>				
Strict	<i>emrA</i>	antibiotic efflux	99.49	100.00
Strict	<i>rsmA</i>	antibiotic efflux	85.25	100.00
Strict	<i>gadX</i>	antibiotic efflux	98.18	100.00
Strict	<i>mdtF</i>	antibiotic efflux	99.81	100.00
Strict	<i>mdtE</i>	antibiotic efflux	99.48	100.00
Strict	<i>CRP</i>	antibiotic efflux	99.52	100.00
Strict	<i>mdtM</i>	antibiotic efflux	98.05	100.00
Strict	<i>acrB</i>	antibiotic efflux	99.81	100.00
Strict	<i>Escherichia coli ampC1 beta-lactamase</i>	antibiotic inactivation	98.16	100.00
Strict	<i>acrD</i>	antibiotic efflux	99.81	100.00
Strict	<i>YojI</i>	antibiotic efflux	99.45	100.00
Strict	<i>PmrF</i>	antibiotic target alteration	99.38	100.00
Strict	<i>TolC</i>	antibiotic efflux	99.8	99.60
Strict	<i>kdpE</i>	antibiotic efflux	98.67	100.00
Strict	<i>mdtP</i>	antibiotic efflux	97.95	100.00
Strict	<i>mdtO</i>	antibiotic efflux	98.83	100.00
Strict	<i>mdtN</i>	antibiotic efflux	99.42	100.00
Strict	<i>Escherichia coli ampC beta-lactamase</i>	antibiotic inactivation	97.08	100.00
Strict	<i>AcrE</i>	antibiotic efflux	99.74	100.00
Strict	<i>Escherichia coli mdfA</i>	antibiotic efflux	97.07	100.00
Strict	<i>mdtH</i>	antibiotic efflux	99.75	100.00
Strict	<i>baeR</i>	antibiotic efflux	99.58	100.00
Strict	<i>baeS</i>	antibiotic efflux	99.36	100.00
Strict	<i>mdtC</i>	antibiotic efflux	99.41	100.00
Strict	<i>mdtB</i>	antibiotic efflux	99.62	100.00
Strict	<i>mdtA</i>	antibiotic efflux	99.04	100.00
Strict	<i>emrY</i>	antibiotic efflux	99.22	100.00
Strict	<i>Klebsiella pneumoniae KpnF</i>	antibiotic efflux	84.4	100.00
Strict	<i>Klebsiella pneumoniae KpnE</i>	antibiotic efflux	82.2	100.83
Strict	<i>ugd</i>	antibiotic target alteration	99.23	100.00
Strict	<i>Escherichia coli emrE</i>	antibiotic efflux	98.0	90.91
Strict	<i>Haemophilus influenzae PBP3 conferring resistance to beta-lactam antibiotics</i>	antibiotic target alteration	53.11	96.39
Strict	<i>Escherichia coli GlpT with mutation conferring resistance to fosfomicin</i>	antibiotic target alteration	99.12	100.00
Strict	<i>Escherichia coli EF-Tu mutants conferring resistance to Pulvomycin</i>	antibiotic target alteration	100.0	44.74
Strict	<i>Escherichia coli EF-Tu mutants conferring resistance to Pulvomycin</i>	antibiotic target alteration	100.0	20.54
Strict	<i>Escherichia coli EF-Tu mutants conferring resistance to Pulvomycin</i>	antibiotic target alteration	100.0	20.54
Strict	<i>Escherichia coli acrR with mutation conferring multidrug antibiotic resistance</i>	antibiotic target alteration, antibiotic efflux	100.0	100.00

Strict	<i>Escherichia coli</i> <i>soxS</i> with mutation conferring antibiotic resistance	antibiotic target alteration, antibiotic efflux, reduced permeability to antibiotic	100.0	100.00
Strict	<i>Escherichia coli</i> <i>soxR</i> with mutation conferring antibiotic resistance	antibiotic target alteration, antibiotic efflux	100.0	100.00
Strict	<i>Escherichia coli</i> <i>marR</i> mutant conferring antibiotic resistance	antibiotic target alteration, antibiotic efflux	98.61	100.00
Perfect	<i>emrR</i>	antibiotic efflux	100.0	100.00
Perfect	<i>emrB</i>	antibiotic efflux	100.0	100.00
Perfect	<i>Escherichia coli</i> <i>ampH</i> beta-lactamase	antibiotic inactivation	100.0	100.00
Perfect	<i>Escherichia coli</i> <i>acrA</i>	antibiotic efflux	100.0	100.00
Perfect	<i>bacA</i>	antibiotic target alteration	100.0	100.00
Perfect	<i>eptA</i>	antibiotic target alteration	100.0	100.00
Perfect	<i>AcrS</i>	antibiotic efflux	100.0	100.00
Perfect	<i>marA</i>	antibiotic efflux, reduced permeability to antibiotic	100.0	100.00
Perfect	<i>msbA</i>	antibiotic efflux	100.0	100.00
Perfect	<i>cpxA</i>	antibiotic efflux	100.0	100.00
Perfect	<i>evgA</i>	antibiotic efflux	100.0	100.00
Perfect	<i>emrK</i>	antibiotic efflux	100.0	110.26
Perfect	<i>H-NS</i>	antibiotic efflux	100.0	100.00
<i>E. coli</i> 29				
Strict	<i>mdtM</i>	antibiotic efflux	98.05	100.00
Strict	<i>gadX</i>	antibiotic efflux	98.18	100.00
Strict	<i>mdtF</i>	antibiotic efflux	99.81	100.00
Strict	<i>mdtE</i>	antibiotic efflux	99.48	100.00
Strict	<i>CRP</i>	antibiotic efflux	99.52	100.00
Strict	<i>rsmA</i>	antibiotic efflux	85.25	100.00
Strict	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>KpnF</i>	antibiotic efflux	84.4	100.00
Strict	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>KpnE</i>	antibiotic efflux	82.2	100.83
Strict	<i>acrB</i>	antibiotic efflux	99.81	100.00
Strict	<i>Escherichia coli</i> <i>mdfA</i>	antibiotic efflux	97.07	100.00
Strict	<i>Escherichia coli</i> <i>ampC1</i> beta-lactamase	antibiotic inactivation	98.16	100.00
Strict	<i>acrD</i>	antibiotic efflux	99.9	100.00
Strict	<i>AcrE</i>	antibiotic efflux	99.74	100.00
Strict	<i>mdtP</i>	antibiotic efflux	97.95	100.00
Strict	<i>mdtO</i>	antibiotic efflux	98.83	100.00
Strict	<i>mdtN</i>	antibiotic efflux	99.42	100.00
Strict	<i>Escherichia coli</i> <i>ampC</i> beta-lactamase	antibiotic inactivation	97.08	100.00
Strict	<i>YojI</i>	antibiotic efflux	99.45	100.00
Strict	<i>kdpE</i>	antibiotic efflux	98.67	100.00
Strict	<i>ugd</i>	antibiotic target alteration	99.23	100.00
Strict	<i>mdtA</i>	antibiotic efflux	99.04	100.00
Strict	<i>mdtB</i>	antibiotic efflux	99.62	100.00
Strict	<i>mdtC</i>	antibiotic efflux	99.51	100.00
Strict	<i>baeS</i>	antibiotic efflux	99.36	100.00
Strict	<i>baeR</i>	antibiotic efflux	99.58	100.00
Strict	<i>TolC</i>	antibiotic efflux	99.8	99.60
Strict	<i>mdtH</i>	antibiotic efflux	99.75	100.00
Strict	<i>PmrF</i>	antibiotic target alteration	99.38	100.00
Strict	<i>emrY</i>	antibiotic efflux	99.22	100.00
Strict	<i>emrA</i>	antibiotic efflux	99.49	100.00
Strict	<i>Escherichia coli</i> <i>emrE</i>	antibiotic efflux	98.18	100.00
Strict	<i>Haemophilus influenzae</i> <i>PBP3</i> conferring resistance to beta-lactam antibiotics	antibiotic target alteration	53.11	96.39
Strict	<i>Escherichia coli</i> <i>GlpT</i> with mutation conferring resistance to fosfomicin	antibiotic target alteration	99.12	100.00

Strict	<i>Escherichia coli</i> EF-Tu mutants conferring resistance to Pulvomycin	antibiotic target alteration	100.0	44.74
Strict	<i>Escherichia coli</i> EF-Tu mutants conferring resistance to Pulvomycin	antibiotic target alteration	100.0	23.23
Strict	<i>Escherichia coli</i> EF-Tu mutants conferring resistance to Pulvomycin	antibiotic target alteration	100.0	23.23
Strict	<i>Escherichia coli</i> acrR with mutation conferring multidrug antibiotic resistance	antibiotic target alteration, antibiotic efflux	100.0	100.00
Strict	<i>Escherichia coli</i> soxS with mutation conferring antibiotic resistance	antibiotic target alteration, antibiotic efflux, reduced permeability to antibiotic	100.0	100.00
Strict	<i>Escherichia coli</i> soxR with mutation conferring antibiotic resistance	antibiotic target alteration, antibiotic efflux	100.0	100.00
Strict	<i>Escherichia coli</i> marR mutant conferring antibiotic resistance	antibiotic target alteration, antibiotic efflux	98.61	100.00
Perfect	<i>Escherichia coli</i> acrA	antibiotic efflux	100.0	100.00
Perfect	<i>Escherichia coli</i> ampH beta-lactamase	antibiotic inactivation	100.0	100.00
Perfect	msbA	antibiotic efflux	100.0	100.00
Perfect	AcrS	antibiotic efflux	100.0	100.00
Perfect	eptA	antibiotic target alteration	100.0	100.00
Perfect	marA	antibiotic efflux, reduced permeability to antibiotic	100.0	100.00
Perfect	bacA	antibiotic target alteration	100.0	100.00
Perfect	H-NS	antibiotic efflux	100.0	100.00
Perfect	cpxA	antibiotic efflux	100.0	100.00
Perfect	evgA	antibiotic efflux	100.0	100.00
Perfect	emrK	antibiotic efflux	100.0	110.26
Perfect	emrR	antibiotic efflux	100.0	100.00
Perfect	emrB	antibiotic efflux	100.0	100.00
<i>E. coli</i> 24				
Perfect	emrR	antibiotic efflux	100.0	100.00
Perfect	emrB	antibiotic efflux	100.0	100.00
Perfect	emrK	antibiotic efflux	100.0	110.26
Perfect	evgA	antibiotic efflux	100.0	100.00
Perfect	msbA	antibiotic efflux	100.0	100.00
Perfect	eptA	antibiotic target alteration	100.0	100.00
Perfect	<i>Escherichia coli</i> acrA	antibiotic efflux	100.0	100.00
Perfect	<i>Escherichia coli</i> ampH beta-lactamase	antibiotic inactivation	100.0	100.00
Perfect	bacA	antibiotic target alteration	100.0	100.00
Perfect	AcrS	antibiotic efflux	100.0	100.00
Perfect	marA	antibiotic efflux, reduced permeability to antibiotic	100.0	100.00
Perfect	H-NS	antibiotic efflux	100.0	100.00
Perfect	cpxA	antibiotic efflux	100.0	100.00
Strict	mdtM	antibiotic efflux	98.05	100.00
Strict	emrA	antibiotic efflux	99.49	100.00
Strict	rsmA	antibiotic efflux	85.25	100.00
Strict	CRP	antibiotic efflux	99.52	100.00
Strict	mdtE	antibiotic efflux	99.48	100.00
Strict	mdtF	antibiotic efflux	99.81	100.00
Strict	gadX	antibiotic efflux	98.18	100.00
Strict	YojI	antibiotic efflux	99.27	100.00
Strict	PmrF	antibiotic target alteration	99.38	100.00
Strict	emrY	antibiotic efflux	99.22	100.00
Strict	evgS	antibiotic efflux	97.83	100.00
Strict	<i>Escherichia coli</i> ampC1 beta-lactamase	antibiotic inactivation	98.16	100.00
Strict	acrD	antibiotic efflux	99.9	100.00

Strict	<i>Escherichia coli mdfA</i>	antibiotic efflux	97.07	100.00
Strict	<i>mdtP</i>	antibiotic efflux	97.95	100.00
Strict	<i>mdtO</i>	antibiotic efflux	98.98	100.00
Strict	<i>mdtN</i>	antibiotic efflux	99.42	100.00
Strict	<i>Escherichia coli ampC beta-lactamase</i>	antibiotic inactivation	97.08	100.00
Strict	<i>acrB</i>	antibiotic efflux	99.81	100.00
Strict	<i>Klebsiella pneumoniae KpnE</i>	antibiotic efflux	82.2	100.83
Strict	<i>Klebsiella pneumoniae KpnF</i>	antibiotic efflux	84.4	100.00
Strict	<i>kdpE</i>	antibiotic efflux	98.67	100.00
Strict	<i>TolC</i>	antibiotic efflux	99.8	99.60
Strict	<i>ugd</i>	antibiotic target alteration	99.23	100.00
Strict	<i>mdtA</i>	antibiotic efflux	99.04	100.00
Strict	<i>mdtB</i>	antibiotic efflux	99.71	100.00
Strict	<i>mdtC</i>	antibiotic efflux	99.51	100.00
Strict	<i>baeS</i>	antibiotic efflux	99.36	100.00
Strict	<i>baeR</i>	antibiotic efflux	99.58	100.00
Strict	<i>AcrE</i>	antibiotic efflux	99.74	100.00
Strict	<i>mdtH</i>	antibiotic efflux	99.75	100.00
Strict	<i>Escherichia coli emrE</i>	antibiotic efflux	98.18	100.00
Strict	<i>Haemophilus influenzae PBP3 conferring resistance to beta-lactam antibiotics</i>	antibiotic target alteration	53.11	96.39
Strict	<i>Escherichia coli EF-Tu mutants conferring resistance to Pulvomycin</i>	antibiotic target alteration	99.75	96.33
Strict	<i>Escherichia coli GlpT with mutation conferring resistance to fosfomycin</i>	antibiotic target alteration	99.12	100.00
Strict	<i>Escherichia coli EF-Tu mutants conferring resistance to Pulvomycin</i>	antibiotic target alteration	99.75	96.33
Strict	<i>Escherichia coli soxS with mutation conferring antibiotic resistance</i>	antibiotic target alteration, antibiotic efflux, reduced permeability to antibiotic	100.0	100.00
Strict	<i>Escherichia coli soxR with mutation conferring antibiotic resistance</i>	antibiotic target alteration, antibiotic efflux	100.0	100.00
Strict	<i>Escherichia coli acrR with mutation conferring multidrug antibiotic resistance</i>	antibiotic target alteration, antibiotic efflux	99.53	100.00
Strict	<i>Escherichia coli marR mutant conferring antibiotic resistance</i>	antibiotic target alteration, antibiotic efflux	97.92	100.00
<i>E. coli 50</i>				
Strict	<i>Klebsiella pneumoniae KpnE</i>	antibiotic efflux	82.2	100.83
Strict	<i>Klebsiella pneumoniae KpnF</i>	antibiotic efflux	84.4	100.00
Strict	<i>emrA</i>	antibiotic efflux	99.74	100.00
Strict	<i>rsmA</i>	antibiotic efflux	85.25	100.00
Strict	<i>Escherichia coli mdfA</i>	antibiotic efflux	96.83	100.00
Strict	<i>Escherichia coli ampH beta-lactamase</i>	antibiotic inactivation	99.74	100.00
Strict	<i>gadX</i>	antibiotic efflux	98.54	100.00
Strict	<i>mdtF</i>	antibiotic efflux	99.71	100.00
Strict	<i>CRP</i>	antibiotic efflux	99.52	100.00
Strict	<i>Escherichia coli ampC1 beta-lactamase</i>	antibiotic inactivation	98.62	100.00
Strict	<i>acrD</i>	antibiotic efflux	99.9	100.00
Strict	<i>YojI</i>	antibiotic efflux	99.63	100.00
Strict	<i>AcrS</i>	antibiotic efflux	99.55	100.00
Strict	<i>AcrE</i>	antibiotic efflux	99.74	100.00
Strict	<i>mdtP</i>	antibiotic efflux	97.75	100.00
Strict	<i>mdtO</i>	antibiotic efflux	99.12	100.00
Strict	<i>mdtN</i>	antibiotic efflux	99.42	100.00
Strict	<i>eptA</i>	antibiotic target alteration	99.63	100.00
Strict	<i>Escherichia coli ampC beta-lactamase</i>	antibiotic inactivation	97.35	100.00

Strict	<i>bacA</i>	antibiotic target alteration	99.63	100.00
Strict	<i>ugd</i>	antibiotic target alteration	98.45	100.00
Strict	<i>marA</i>	antibiotic efflux, reduced permeability to antibiotic	99.21	100.00
Strict	<i>baeR</i>	antibiotic efflux	99.58	100.00
Strict	<i>mdtC</i>	antibiotic efflux	99.71	100.00
Strict	<i>mdtB</i>	antibiotic efflux	99.71	100.00
Strict	<i>mdtA</i>	antibiotic efflux	99.04	100.00
Strict	<i>mdtM</i>	antibiotic efflux	98.05	100.00
Strict	<i>FosA7</i>	antibiotic inactivation	93.57	100.00
Strict	<i>emrK</i>	antibiotic efflux	99.72	110.26
Strict	<i>evgA</i>	antibiotic efflux	99.51	100.00
Strict	<i>evgS</i>	antibiotic efflux	99.42	100.00
Strict	<i>Escherichia coli GlpT with mutation conferring resistance to fosfomycin</i>	antibiotic target alteration	99.34	100.00
Strict	<i>Haemophilus influenzae PBP3 conferring resistance to beta-lactam antibiotics</i>	antibiotic target alteration	53.11	96.39
Strict	<i>Escherichia coli EF-Tu mutants conferring resistance to Pulvomycin</i>	antibiotic target alteration	100.0	66.01
Strict	<i>Escherichia coli acrR with mutation conferring multidrug antibiotic resistance</i>	antibiotic target alteration, antibiotic efflux	100.0	100.00
Strict	<i>Escherichia coli soxS with mutation conferring antibiotic resistance</i>	antibiotic target alteration, antibiotic efflux, reduced permeability to antibiotic	100.0	100.00
Strict	<i>Escherichia coli soxR with mutation conferring antibiotic resistance</i>	antibiotic target alteration, antibiotic efflux	100.0	100.00
Strict	<i>Escherichia coli marR mutant conferring antibiotic resistance</i>	antibiotic target alteration, antibiotic efflux	97.92	100.00
Perfect	<i>emrR</i>	antibiotic efflux	100.0	100.00
Perfect	<i>emrB</i>	antibiotic efflux	100.0	100.00
Perfect	<i>msbA</i>	antibiotic efflux	100.0	100.00
Perfect	<i>Escherichia coli acrA</i>	antibiotic efflux	100.0	100.00
Perfect	<i>acrB</i>	antibiotic efflux	100.0	100.00
Perfect	<i>mdtE</i>	antibiotic efflux	100.0	100.00
Perfect	<i>PmrF</i>	antibiotic target alteration	100.0	100.00
Perfect	<i>kdpE</i>	antibiotic efflux	100.0	100.00
Perfect	<i>TolC</i>	antibiotic efflux	100.0	99.60
Perfect	<i>H-NS</i>	antibiotic efflux	100.0	100.00
Perfect	<i>baeS</i>	antibiotic efflux	100.0	100.00
Perfect	<i>mdtG</i>	antibiotic efflux	100.0	100.0
Perfect	<i>mdtH</i>	antibiotic efflux	100.0	100.00
Perfect	<i>cpxA</i>	antibiotic efflux	100.0	100.00
Perfect	<i>emrY</i>	antibiotic efflux	100.0	100.00
<i>E. coli 52</i>				
Strict	<i>Klebsiella pneumoniae KpnF</i>	antibiotic efflux	84.4	100.00
Strict	<i>Klebsiella pneumoniae KpnE</i>	antibiotic efflux	82.2	100.83
Strict	<i>emrA</i>	antibiotic efflux	99.74	100.00
Strict	<i>rsmA</i>	antibiotic efflux	85.25	100.00
Strict	<i>Escherichia coli mdfA</i>	antibiotic efflux	96.83	100.00
Strict	<i>Escherichia coli ampH beta-lactamase</i>	antibiotic inactivation	99.74	100.00
Strict	<i>gadX</i>	antibiotic efflux	98.54	100.00
Strict	<i>mdtF</i>	antibiotic efflux	99.71	100.00
Strict	<i>CRP</i>	antibiotic efflux	99.52	100.00
Strict	<i>acrD</i>	antibiotic efflux	99.9	100.00
Strict	<i>Escherichia coli ampC1 beta-lactamase</i>	antibiotic inactivation	98.62	100.00
Strict	<i>YojI</i>	antibiotic efflux	99.63	100.00

Strict	<i>AcrS</i>	antibiotic efflux	99.55	100.00
Strict	<i>AcrE</i>	antibiotic efflux	99.74	100.00
Strict	<i>mdtP</i>	antibiotic efflux	97.75	100.00
Strict	<i>mdtO</i>	antibiotic efflux	99.12	100.00
Strict	<i>mdtN</i>	antibiotic efflux	99.42	100.00
Strict	<i>eptA</i>	antibiotic target alteration	99.63	100.00
Strict	<i>Escherichia coli ampC beta-lactamase</i>	antibiotic inactivation	97.35	100.00
Strict	<i>mdtM</i>	antibiotic efflux	98.05	100.00
Strict	<i>FosA7</i>	antibiotic inactivation	93.57	100.00
Strict	<i>bacA</i>	antibiotic target alteration	99.63	100.00
Strict	<i>ugd</i>	antibiotic target alteration	98.45	100.00
Strict	<i>marA</i>	antibiotic efflux, reduced permeability to antibiotic	99.21	100.00
Strict	<i>baeR</i>	antibiotic efflux	99.58	100.00
Strict	<i>mdtC</i>	antibiotic efflux	99.71	100.00
Strict	<i>mdtB</i>	antibiotic efflux	99.71	100.00
Strict	<i>mdtA</i>	antibiotic efflux	99.04	100.00
Strict	<i>emrK</i>	antibiotic efflux	99.72	110.26
Strict	<i>evgA</i>	antibiotic efflux	99.51	100.00
Strict	<i>evgS</i>	antibiotic efflux	99.42	100.00
Strict	<i>Escherichia coli GlpT with mutation conferring resistance to fosfomycin</i>	antibiotic target alteration	99.34	100.00
Strict	<i>Haemophilus influenzae PBP3 conferring resistance to beta-lactam antibiotics</i>	antibiotic target alteration	53.11	96.39
Strict	<i>Escherichia coli EF-Tu mutants conferring resistance to Pulvomycin</i>	antibiotic target alteration	100.0	77.75
Strict	<i>Escherichia coli acrR with mutation conferring multidrug antibiotic resistance</i>	antibiotic target alteration, antibiotic efflux	100.0	100.00
Strict	<i>Escherichia coli soxS with mutation conferring antibiotic resistance</i>	antibiotic target alteration, antibiotic efflux, reduced permeability to antibiotic	100.0	100.00
Strict	<i>Escherichia coli soxR with mutation conferring antibiotic resistance</i>	antibiotic target alteration, antibiotic efflux	100.0	100.00
Strict	<i>Escherichia coli marR mutant conferring antibiotic resistance</i>	antibiotic target alteration, antibiotic efflux	97.92	100.00
Perfect	<i>emrR</i>	antibiotic efflux	100.0	100.00
Perfect	<i>emrB</i>	antibiotic efflux	100.0	100.00
Perfect	<i>msbA</i>	antibiotic efflux	100.0	100.00
Perfect	<i>acrB</i>	antibiotic efflux	100.0	100.00
Perfect	<i>Escherichia coli acrA</i>	antibiotic efflux	100.0	100.00
Perfect	<i>mdtE</i>	antibiotic efflux	100.0	100.00
Perfect	<i>PmrF</i>	antibiotic target alteration	100.0	100.00
Perfect	<i>kdpE</i>	antibiotic efflux	100.0	100.00
Perfect	<i>TolC</i>	antibiotic efflux	100.0	99.60
Perfect	<i>H-NS</i>	antibiotic efflux	100.0	100.00
Perfect	<i>baeS</i>	antibiotic efflux	100.0	100.00
Perfect	<i>mdtH</i>	antibiotic efflux	100.0	100.00
Perfect	<i>mdtG</i>	antibiotic efflux	100.0	100.00
Perfect	<i>cpxA</i>	antibiotic efflux	100.0	100.00
Perfect	<i>emrY</i>	antibiotic efflux	100.0	100.00
<i>E. coli 53</i>				
Perfect	<i>acrD</i>	antibiotic efflux	100.0	100.00
Perfect	<i>evgA</i>	antibiotic efflux	100.0	100.00
Perfect	<i>emrY</i>	antibiotic efflux	100.0	100.00
Perfect	<i>emrR</i>	antibiotic efflux	100.0	100.00
Perfect	<i>emrB</i>	antibiotic efflux	100.0	100.00

Perfect	<i>mdtN</i>	antibiotic efflux	100.0	100.00
Perfect	<i>mdtH</i>	antibiotic efflux	100.0	100.00
Perfect	<i>mdtG</i>	antibiotic efflux	100.0	100.00
Perfect	<i>TolC</i>	antibiotic efflux	100.0	99.60
Perfect	<i>msbA</i>	antibiotic efflux	100.0	100.00
Perfect	<i>AcrE</i>	antibiotic efflux	100.0	100.00
Perfect	<i>Escherichia coli acrA</i>	antibiotic efflux	100.0	100.00
Perfect	<i>marA</i>	antibiotic efflux, reduced permeability to antibiotic	100.0	100.00
Perfect	<i>cpxA</i>	antibiotic efflux	100.0	100.00
Strict	<i>Klebsiella pneumoniae KpnF</i>	antibiotic efflux	84.4	100.00
Strict	<i>Klebsiella pneumoniae KpnE</i>	antibiotic efflux	82.2	100.83
Strict	<i>Escherichia coli ampC1 beta-lactamase</i>	antibiotic inactivation	99.08	100.00
Strict	<i>evgS</i>	antibiotic efflux	99.08	100.00
Strict	<i>emrK</i>	antibiotic efflux	99.43	110.26
Strict	<i>emrA</i>	antibiotic efflux	99.74	100.00
Strict	<i>rsmA</i>	antibiotic efflux	85.25	100.00
Strict	<i>mdtM</i>	antibiotic efflux	97.8	100.00
Strict	<i>mdtP</i>	antibiotic efflux	97.54	100.00
Strict	<i>mdtO</i>	antibiotic efflux	99.12	100.00
Strict	<i>eptA</i>	antibiotic target alteration	99.63	100.0
Strict	<i>bacA</i>	antibiotic target alteration	99.63	100.00
Strict	<i>PmrF</i>	antibiotic target alteration	99.69	100.00
Strict	<i>kdpE</i>	antibiotic efflux	99.11	100.00
Strict	<i>H-NS</i>	antibiotic efflux	99.27	100.00
Strict	<i>ugd</i>	antibiotic target alteration	98.71	100.00
Strict	<i>mdtA</i>	antibiotic efflux	99.28	100.00
Strict	<i>mdtB</i>	antibiotic efflux	99.42	100.00
Strict	<i>mdtC</i>	antibiotic efflux	99.61	100.00
Strict	<i>baeS</i>	antibiotic efflux	99.14	100.00
Strict	<i>baeR</i>	antibiotic efflux	99.58	100.00
Strict	<i>Escherichia coli mdfA</i>	antibiotic efflux	96.59	100.00
Strict	<i>AcrF</i>	antibiotic efflux	99.52	100.00
Strict	<i>AcrS</i>	antibiotic efflux	99.55	100.00
Strict	<i>acrB</i>	antibiotic efflux	99.9	100.00
Strict	<i>Escherichia coli ampH beta-lactamase</i>	antibiotic inactivation	99.74	100.00
Strict	<i>CRP</i>	antibiotic efflux	99.52	100.00
Strict	<i>Escherichia coli ampC beta-lactamase</i>	antibiotic inactivation	97.35	100.00
Strict	<i>mdtE</i>	antibiotic efflux	99.74	100.00
Strict	<i>mdtF</i>	antibiotic efflux	99.81	100.00
Strict	<i>gadX</i>	antibiotic efflux	98.54	100.00
Strict	<i>YojI</i>	antibiotic efflux	99.45	100.00
Strict	<i>Haemophilus influenzae PBP3 conferring resistance to beta-lactam antibiotics</i>	antibiotic target alteration	53.11	96.39
Strict	<i>Escherichia coli GlpT with mutation conferring resistance to fosfomycin</i>	antibiotic target alteration	99.78	100.00
Strict	<i>Escherichia coli EF-Tu mutants conferring resistance to Pulvomycin</i>	antibiotic target alteration	99.75	96.33
Strict	<i>Escherichia coli EF-Tu mutants conferring resistance to Pulvomycin</i>	antibiotic target alteration	99.75	96.33
Strict	<i>Escherichia coli soxS with mutation conferring antibiotic resistance</i>	antibiotic target alteration, antibiotic efflux, reduced permeability to antibiotic	100.0	100.00
Strict	<i>Escherichia coli soxR with mutation conferring antibiotic resistance</i>	antibiotic target alteration, antibiotic efflux	100.0	100.00
Strict	<i>Escherichia coli acrR with mutation conferring multidrug antibiotic resistance</i>	antibiotic target alteration, antibiotic efflux	100.0	100.00

Strict	<i>Escherichia coli marR mutant conferring antibiotic resistance</i>	antibiotic target alteration, antibiotic efflux	98.61	100.00
<i>E. coli 60</i>				
Strict	<i>bacA</i>	antibiotic target alteration	99.63	100.00
Strict	<i>Klebsiella pneumoniae KpnE</i>	antibiotic efflux	82.2	100.83
Strict	<i>Klebsiella pneumoniae KpnF</i>	antibiotic efflux	84.4	100.00
Strict	<i>mdtM</i>	antibiotic efflux	97.8	100.00
Strict	<i>emrA</i>	antibiotic efflux	99.74	100.00
Strict	<i>rsmA</i>	antibiotic efflux	85.25	100.00
Strict	<i>mdtP</i>	antibiotic efflux	97.54	100.00
Strict	<i>mdtO</i>	antibiotic efflux	99.12	100.00
Strict	<i>eptA</i>	antibiotic target alteration	99.63	100.00
Strict	<i>CRP</i>	antibiotic efflux	99.52	100.00
Strict	<i>Escherichia coli ampC1 beta-lactamase</i>	antibiotic inactivation	99.08	100.00
Strict	<i>evgS</i>	antibiotic efflux	99.08	100.00
Strict	<i>emrK</i>	antibiotic efflux	99.43	110.26
Strict	<i>kdpE</i>	antibiotic efflux	99.11	100.00
Strict	<i>PmrF</i>	antibiotic target alteration	99.69	100.00
Strict	<i>baeR</i>	antibiotic efflux	99.58	100.00
Strict	<i>baeS</i>	antibiotic efflux	99.14	100.00
Strict	<i>mdtC</i>	antibiotic efflux	99.61	100.00
Strict	<i>mdtB</i>	antibiotic efflux	99.42	100.00
Strict	<i>mdtA</i>	antibiotic efflux	99.28	100.00
Strict	<i>ugd</i>	antibiotic target alteration	98.71	100.00
Strict	<i>Escherichia coli ampH beta-lactamase</i>	antibiotic inactivation	99.74	100.00
Strict	<i>acrB</i>	antibiotic efflux	99.9	100.00
Strict	<i>YojI</i>	antibiotic efflux	99.45	100.00
Strict	<i>Escherichia coli mdfA</i>	antibiotic efflux	96.59	100.00
Strict	<i>H-NS</i>	antibiotic efflux	99.27	100.00
Strict	<i>AcrS</i>	antibiotic efflux	99.55	100.00
Strict	<i>AcrF</i>	antibiotic efflux	99.52	100.00
Strict	<i>Escherichia coli ampC beta-lactamase</i>	antibiotic inactivation	97.35	100.00
Strict	<i>mdtE</i>	antibiotic efflux	99.74	100.00
Strict	<i>mdtF</i>	antibiotic efflux	99.81	100.00
Strict	<i>gadX</i>	antibiotic efflux	98.54	100.00
Strict	<i>Haemophilus influenzae PBP3 conferring resistance to beta-lactam antibiotics</i>	antibiotic target alteration	53.11	96.39
Strict	<i>Escherichia coli EF-Tu mutants conferring resistance to Pulvomycin</i>	antibiotic target alteration	99.75	96.33
Strict	<i>Escherichia coli GIpT with mutation conferring resistance to fosfomycin</i>	antibiotic target alteration	99.78	100.00
Strict	<i>Escherichia coli EF-Tu mutants conferring resistance to Pulvomycin</i>	antibiotic target alteration	99.75	96.33
Strict	<i>Escherichia coli soxS with mutation conferring antibiotic resistance</i>	antibiotic target alteration, antibiotic efflux, reduced permeability to antibiotic	100.0	100.00
Strict	<i>Escherichia coli soxR with mutation conferring antibiotic resistance</i>	antibiotic target alteration, antibiotic efflux	100.0	100.00
Strict	<i>Escherichia coli acrR with mutation conferring multidrug antibiotic resistance</i>	antibiotic target alteration, antibiotic efflux	100.0	100.00
Strict	<i>Escherichia coli marR mutant conferring antibiotic resistance</i>	antibiotic target alteration, antibiotic efflux	98.61	100.00
Perfect	<i>TolC</i>	antibiotic efflux	100.0	99.60
Perfect	<i>emrR</i>	antibiotic efflux	100.0	100.00
Perfect	<i>emrB</i>	antibiotic efflux	100.0	100.00
Perfect	<i>mdtN</i>	antibiotic efflux	100.0	100.00

Perfect	<i>acrD</i>	antibiotic efflux	100.0	100.00
Perfect	<i>evgA</i>	antibiotic efflux	100.0	100.00
Perfect	<i>emrY</i>	antibiotic efflux	100.0	100.00
Perfect	<i>Escherichia coli acrA</i>	antibiotic efflux	100.0	100.00
Perfect	<i>msbA</i>	antibiotic efflux	100.0	100.00
Perfect	<i>AcrE</i>	antibiotic efflux	100.0	100.00
Perfect	<i>mdtH</i>	antibiotic efflux	100.0	100.00
Perfect	<i>mdtG</i>	antibiotic efflux	100.0	100.00
Perfect	<i>cpxA</i>	antibiotic efflux	100.0	100.00
Perfect	<i>marA</i>	antibiotic efflux, reduced permeability to antibiotic	100.0	100.00
<i>E. coli 61</i>				
Perfect	<i>emrR</i>	antibiotic efflux	100.0	100.00
Perfect	<i>emrB</i>	antibiotic efflux	100.0	100.00
Perfect	<i>PmrF</i>	antibiotic target alteration	100.0	100.00
Perfect	<i>emrY</i>	antibiotic efflux	100.0	100.00
Perfect	<i>emrK</i>	antibiotic efflux	100.0	110.26
Perfect	<i>evgA</i>	antibiotic efflux	100.0	100.00
Perfect	<i>AcrS</i>	antibiotic efflux	100.0	100.00
Perfect	<i>kdpE</i>	antibiotic efflux	100.0	100.00
Perfect	<i>Escherichia coli acrA</i>	antibiotic efflux	100.0	100.00
Perfect	<i>msbA</i>	antibiotic efflux	100.0	100.00
Perfect	<i>cpxA</i>	antibiotic efflux	100.0	100.00
Perfect	<i>H-NS</i>	antibiotic efflux	100.0	100.00
Perfect	<i>marA</i>	antibiotic efflux, reduced permeability to antibiotic	100.0	100.00
Strict	<i>gadX</i>	antibiotic efflux	98.54	100.00
Strict	<i>mdtF</i>	antibiotic efflux	99.42	100.00
Strict	<i>mdtE</i>	antibiotic efflux	99.74	100.00
Strict	<i>CRP</i>	antibiotic efflux	99.52	100.00
Strict	<i>emrA</i>	antibiotic efflux	99.74	100.00
Strict	<i>rsmA</i>	antibiotic efflux	85.25	100.00
Strict	<i>YojI</i>	antibiotic efflux	99.82	100.00
Strict	<i>evgS</i>	antibiotic efflux	98.75	100.00
Strict	<i>AcrE</i>	antibiotic efflux	99.74	100.00
Strict	<i>Escherichia coli mdfA</i>	antibiotic efflux	96.83	100.00
Strict	<i>Escherichia coli ampC beta-lactamase</i>	antibiotic inactivation	97.35	100.00
Strict	<i>bacA</i>	antibiotic target alteration	99.27	100.00
Strict	<i>TolC</i>	antibiotic efflux	99.59	99.60
Strict	<i>acrB</i>	antibiotic efflux	99.9	100.00
Strict	<i>Escherichia coli ampH beta-lactamase</i>	antibiotic inactivation	99.74	100.00
Strict	<i>acrD</i>	antibiotic efflux	99.71	100.00
Strict	<i>Escherichia coli ampC1 beta-lactamase</i>	antibiotic inactivation	99.31	100.00
Strict	<i>baeR</i>	antibiotic efflux	99.58	100.00
Strict	<i>baeS</i>	antibiotic efflux	99.36	100.00
Strict	<i>mdtC</i>	antibiotic efflux	99.61	100.00
Strict	<i>mdtB</i>	antibiotic efflux	99.71	100.00
Strict	<i>mdtA</i>	antibiotic efflux	99.04	100.00
Strict	<i>ugd</i>	antibiotic target alteration	99.23	100.00
Strict	<i>mdtP</i>	antibiotic efflux	98.16	100.00
Strict	<i>mdtO</i>	antibiotic efflux	98.83	100.00
Strict	<i>mdtN</i>	antibiotic efflux	99.71	100.00
Strict	<i>eptA</i>	antibiotic target alteration	99.63	100.00
Strict	<i>mdtM</i>	antibiotic efflux	97.32	100.00
Strict	<i>mdtH</i>	antibiotic efflux	99.75	100.00
Strict	<i>Klebsiella pneumoniae KpnF</i>	antibiotic efflux	84.4	100.00
Strict	<i>Klebsiella pneumoniae KpnE</i>	antibiotic efflux	82.2	100.83

Strict	<i>Escherichia coli</i> <i>GlpT</i> with mutation conferring resistance to fosfomycin	antibiotic target alteration	99.56	100.00
Strict	<i>Haemophilus influenzae</i> <i>PBP3</i> conferring resistance to beta-lactam antibiotics	antibiotic target alteration	53.11	96.39
Strict	<i>Escherichia coli</i> <i>EF-Tu</i> mutants conferring resistance to Pulvomycin	antibiotic target alteration	100.0	77.75
Strict	<i>Escherichia coli</i> <i>acrR</i> with mutation conferring multidrug antibiotic resistance	antibiotic target alteration, antibiotic efflux	100.0	100.00
Strict	<i>Escherichia coli</i> <i>soxS</i> with mutation conferring antibiotic resistance	antibiotic target alteration, antibiotic efflux, reduced permeability to antibiotic	100.0	100.00
Strict	<i>Escherichia coli</i> <i>soxR</i> with mutation conferring antibiotic resistance	antibiotic target alteration, antibiotic efflux	99.35	100.00
Strict	<i>Escherichia coli</i> <i>marR</i> mutant conferring antibiotic resistance	antibiotic target alteration, antibiotic efflux	98.61	100.00
<i>E. coli</i> 69				
Perfect	<i>acrD</i>	antibiotic efflux	100.0	100.00
Perfect	<i>evgA</i>	antibiotic efflux	100.0	100.00
Perfect	<i>emrY</i>	antibiotic efflux	100.0	100.00
Perfect	<i>emrR</i>	antibiotic efflux	100.0	100.00
Perfect	<i>emrB</i>	antibiotic efflux	100.0	100.00
Perfect	<i>TolC</i>	antibiotic efflux	100.0	99.60
Perfect	<i>msbA</i>	antibiotic efflux	100.0	100.00
Perfect	<i>mdtE</i>	antibiotic efflux	100.0	100.00
Perfect	<i>AcrE</i>	antibiotic efflux	100.0	100.00
Perfect	<i>Escherichia coli</i> <i>acrA</i>	antibiotic efflux	100.0	100.00
Perfect	<i>mdtH</i>	antibiotic efflux	100.0	100.00
Perfect	<i>mdtG</i>	antibiotic efflux	100.0	100.00
Perfect	<i>cpxA</i>	antibiotic efflux	100.0	100.00
Perfect	<i>marA</i>	antibiotic efflux, reduced permeability to antibiotic	100.0	100.00
Perfect	<i>TEM-1</i>	antibiotic inactivation	100.0	100.00
Strict	<i>Escherichia coli</i> <i>ampC1</i> beta-lactamase	antibiotic inactivation	98.62	100.00
Strict	<i>evgS</i>	antibiotic efflux	99.08	100.00
Strict	<i>emrK</i>	antibiotic efflux	99.43	110.26
Strict	<i>PmrF</i>	antibiotic target alteration	99.69	100.00
Strict	<i>emrA</i>	antibiotic efflux	99.74	100.00
Strict	<i>rsmA</i>	antibiotic efflux	85.25	100.00
Strict	<i>mdtA</i>	antibiotic efflux	99.04	100.00
Strict	<i>mdtB</i>	antibiotic efflux	99.62	100.00
Strict	<i>mdtC</i>	antibiotic efflux	99.61	100.00
Strict	<i>baeS</i>	antibiotic efflux	99.14	100.00
Strict	<i>baeR</i>	antibiotic efflux	99.58	100.00
Strict	<i>YojI</i>	antibiotic efflux	99.63	100.00
Strict	<i>bacA</i>	antibiotic target alteration	99.63	100.00
Strict	<i>Escherichia coli</i> <i>mdfA</i>	antibiotic efflux	96.59	100.00
Strict	<i>CRP</i>	antibiotic efflux	99.52	100.00
Strict	<i>kdpE</i>	antibiotic efflux	99.11	100.00
Strict	<i>mdtF</i>	antibiotic efflux	99.81	100.00
Strict	<i>gadX</i>	antibiotic efflux	98.18	100.00
Strict	<i>AcrF</i>	antibiotic efflux	99.42	100.00
Strict	<i>AcrS</i>	antibiotic efflux	99.55	100.00
Strict	<i>acrB</i>	antibiotic efflux	99.9	100.00
Strict	<i>Escherichia coli</i> <i>ampH</i> beta-lactamase	antibiotic inactivation	99.74	100.00
Strict	<i>H-NS</i>	antibiotic efflux	99.27	100.00
Strict	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>KpnE</i>	antibiotic efflux	82.2	100.83

Strict	<i>Klebsiella pneumoniae</i> KpnF	antibiotic efflux	84.4	100.00
Strict	<i>eptA</i>	antibiotic target alteration	99.45	100.00
Strict	<i>mdtN</i>	antibiotic efflux	99.71	100.00
Strict	<i>mdtO</i>	antibiotic efflux	99.12	100.00
Strict	<i>mdtP</i>	antibiotic efflux	97.95	100.00
Strict	<i>Escherichia coli ampC beta-lactamase</i>	antibiotic inactivation	97.35	100.00
Strict	<i>tet(A)</i>	antibiotic efflux	99.74	94.10
Strict	<i>Escherichia coli emrE</i>	antibiotic efflux	98.18	100.00
Strict	<i>mdtM</i>	antibiotic efflux	97.8	100.00
Strict	<i>sul2</i>	antibiotic target replacement	99.63	100.00
Strict	<i>APH(3'')-Ib</i>	antibiotic inactivation	99.63	100.00
Strict	<i>APH(6)-Id</i>	antibiotic inactivation	100.0	91.73
Strict	<i>APH(3')-Ia</i>	antibiotic inactivation	98.52	100.00
Strict	<i>Escherichia coli GlpT with mutation conferring resistance to fosfomycin</i>	antibiotic target alteration	99.78	100.00
Strict	<i>Haemophilus influenzae PBP3 conferring resistance to beta-lactam antibiotics</i>	antibiotic target alteration	53.11	96.39
Strict	<i>Escherichia coli EF-Tu mutants conferring resistance to Pulvomycin</i>	antibiotic target alteration	99.75	96.33
Strict	<i>Escherichia coli EF-Tu mutants conferring resistance to Pulvomycin</i>	antibiotic target alteration	99.75	96.33
Strict	<i>Escherichia coli acrR with mutation conferring multidrug antibiotic resistance</i>	antibiotic target alteration, antibiotic efflux	100.0	100.00
Strict	<i>Escherichia coli soxR with mutation conferring antibiotic resistance</i>	antibiotic target alteration, antibiotic efflux	100.0	100.00
Strict	<i>Escherichia coli soxS with mutation conferring antibiotic resistance</i>	antibiotic target alteration, antibiotic efflux, reduced permeability to antibiotic	100.0	100.00
Strict	<i>Escherichia coli marR mutant conferring antibiotic resistance</i>	antibiotic target alteration, antibiotic efflux	98.61	100.00

ANEXO VIII. ANALISIS ESTADISTICO

Análisis de chi2 para evaluar si los genes *stx1*, *stx2* y las combinaciones, tienen alguna preferencia por los grupos O157 o no-O157.

	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>stx1/stx2</i>	<i>stx1a</i>	<i>stx1c</i>	<i>stx1a,c</i>	<i>solo stx1a</i>
Chi2	554	1469	---	---	---	---	---
p	1,70E-122	2,1344E-321	---	---	---	---	---
p (Monte Carlo)	0,0013	0,0001	---	---	---	---	---
chi2 con corrección de Yates	---	---	382,5	468,5	382,5	382,5	0,5
Hay diferencias significativas SI/NO	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI

	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>stx1/stx2</i>	<i>stx1a</i>	<i>stx1c</i>	<i>stx1a,c</i>	<i>solo stx1a</i>	<i>stx2a</i>	<i>stx2c</i>	<i>stx2d</i>	<i>stx2a/stx2c</i>	<i>stx2a/stx2d</i>	<i>stx2c/stx2d</i>
Chi2	554	1469	---	---	---	---	---	745	---	---	---	---	---
p	1,70E-122	2,1344E-321	---	---	---	---	---	4,90E-164	---	---	---	---	---
p (Monte Carlo)	0,0013	0,0001	---	---	---	---	---	0,0001	---	---	---	---	---
chi2 con corrección de Yates	---	---	382,5	468,5	382,5	382,5	0,5	---	936,5	704,5	36,5	2,5	8,5
Hay diferencias significativas SI/NO	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	NO	SI

Análisis de asociación: estudiar si hay asociación entre la presencia de los genes *stx1*, *stx2*, *stx1/stx2* y los grupos O157 y no-O157.

	Evaluación de asociación entre		
	<i>stx1, stx2 y stx1/stx2</i>	<i>variantes de stx1 (stx1a, stx1c, stx1a,s, stx solo a)</i>	<i>variantes de stx2 (stx2a, stx2c y stx2d)</i>
Chi2	0,79554	1,0289	4,3596
p	0,67182	0,79425	0,11306
p (Monte Carlo)	0,7283	0,8624	0,1084
p (Test exacto de Fisher)	0,76505	0,69241	0,080053
Resultados	No asociados	No asociados	No asociados

Análisis de chi2 para evaluar si el gen *eae* tiene alguna preferencia por los grupos O157 o no-O157, al igual que para las variantes.

	<i>eae</i>	variante <i>eae</i> γ 1	variante <i>eae</i> β 1
Chi2	1433	---	---
p	1,4175E-313	---	---
p (Monte Carlo)	0,0002	---	---
chi2 con corrección de Yates	---	677	26
Hay diferencias significativas SI/NO	SI	SI	SI

Análisis de asociación: estudiar si hay asociación entre la presencia de los genes *eae* y sus variantes y los grupos O157 y no-O157.

	<i>Evaluación de asociación entre eae, gamma 1 y beta 1</i>
Chi2	32,236
p	1,0003E-07
p (Monte Carlo)	0,0001
p (Test exacto de Fisher)	8,63E-07
Resultados	Asociados

Análisis de chi2 para evaluar si los genes de virulencia adicionales tienen alguna preferencia por los grupos O157 o no-O157.

	<i>LPF</i>	<i>hcpA</i>	<i>iha</i>	<i>F9</i>	<i>tccP</i>	<i>espJ</i>	<i>katP</i>	<i>espP</i>
Chi2	---	---	---	1616	---	---	---	1105
p	---	---	---	0	---	---	---	2,71E-242
p (Monte Carlo)	---	---	---	0,0001	---	---	---	0,0001
chi2 con corrección de Yates	1530	850	1453	---	1444	1448	445	---
Hay diferencias significativas SI/NO	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI

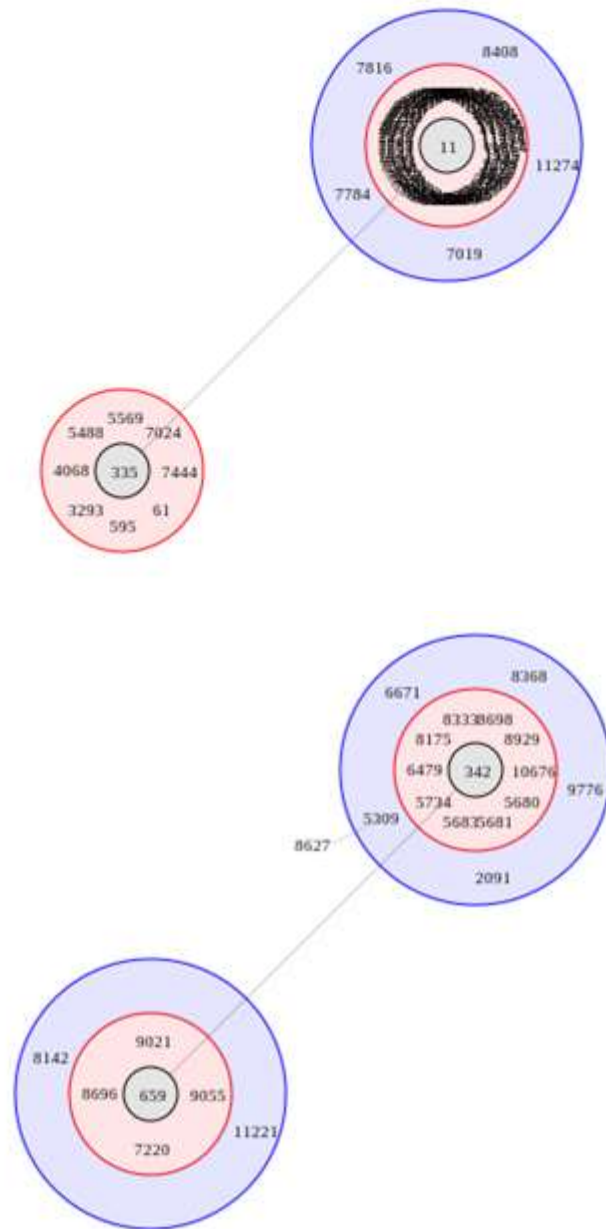
Análisis de chi2 para evaluar si la ocupación de un sitio de inserción tiene alguna preferencia en los grupos O157 o no-O157.

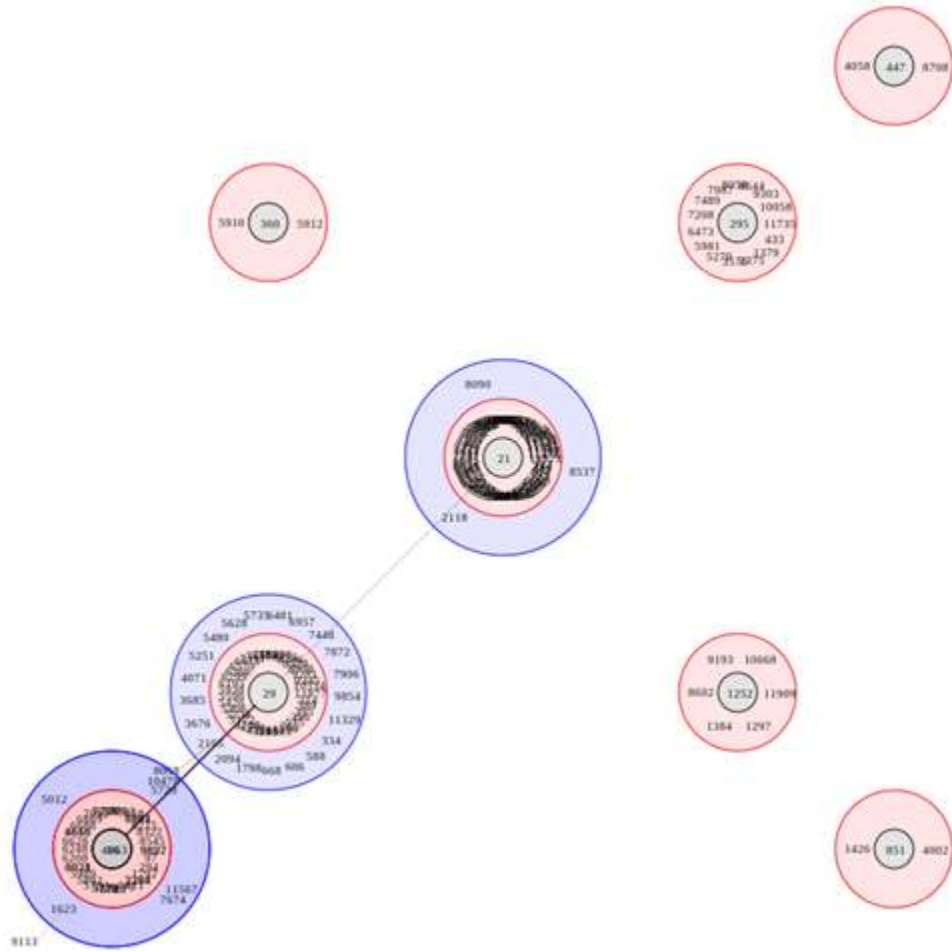
	sitio <i>pheU</i>	Sitio <i>selC</i>	sitio <i>pheV</i>
Chi2	---	---	1010
p	---	---	1,20E-221
p (Monte Carlo)	---	---	0,0005
chi2 con corrección de Yates	50	1609	---
Hay diferencias significativas SI/NO	SI	SI	SI

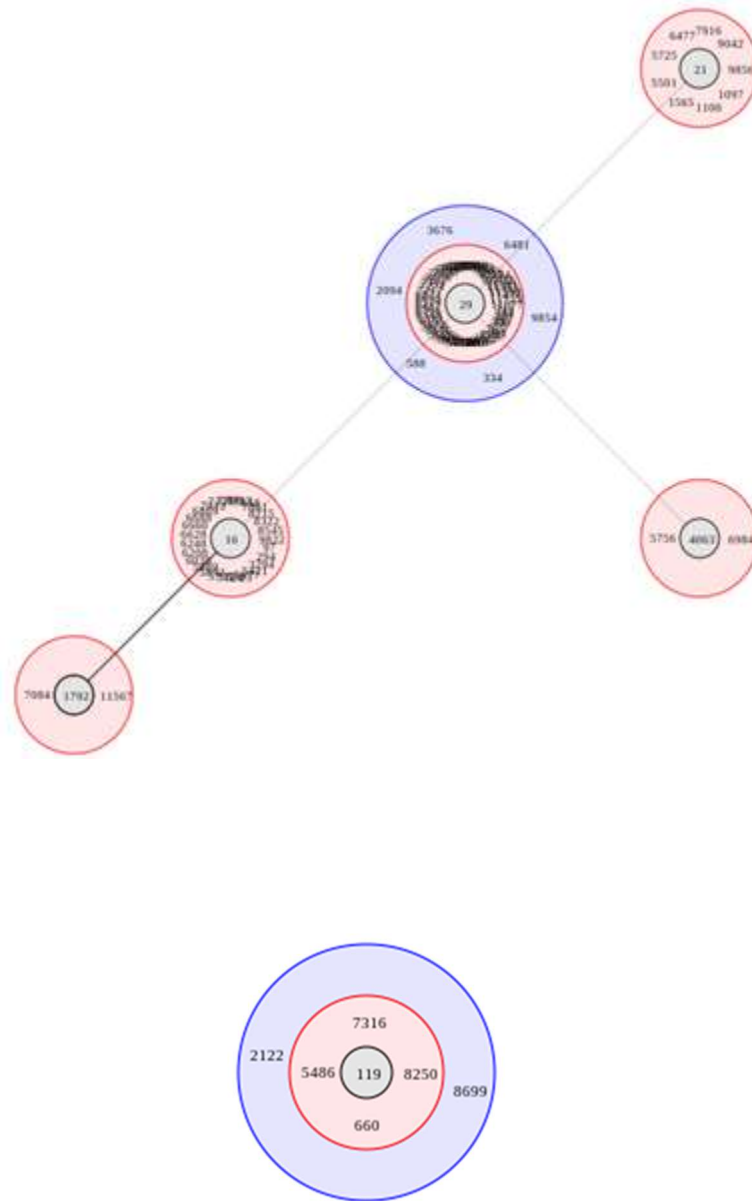
Análisis de asociación: estudiar si hay asociación entre la ocupación de un sitio de inserción de la isla de patogenicidad LEE y los grupos O157 y no-O157.

	Evaluación de asociación entre SelC, PeU y PEV vs. O157, no-O157
Chi2	24,939
p	3,84E-06
p (Monte Carlo)	0,0001
p (Test exacto de Fisher)	2,34E-05
Resultados	Asociados

ANEXO IX. RESULTADOS DEL ANALISIS BURST







Grado de cumplimiento de las diferentes etapas

Año	Actividad	Grado de avance
Primer año	Descongelamiento de las cepas y caracterización bioquímica de las mismas.	100%
	Extracciones de ADN	100%
	Puesta a punto de PFGE para STEC	100%
	PFGE para todas las cepas y análisis de resultados	100%
	PCR para <i>stx1</i> , <i>stx2</i> y <i>eae</i>	100%
	Confirmación del serogrupo por PCR	100%
Segundo año	Identificación de marcadores moleculares que apoyen el diagnóstico	100%
	Elaboración de informe de avances y análisis parcial de resultados	100%
	Variantes de toxinas	100%
	Variantes de <i>eae</i>	100%
	MLST para todas las cepas seleccionadas.	100%
	Búsqueda de otros genes de virulencia.	100%
	Determinación de los sitios de inserción de la isla de patogenicidad <i>LEE</i>	Etapa agregada. 100%
	Identificación de los clados a los que pertenecen las cepas O157:H7	100%
	Elaboración de informe de avances y análisis parcial de resultados	100%
	Perfiles de resistencia / sensibilidad de los aislamientos	100%
Tercer año	Secuenciación completa de genomas, ensamblado y análisis	100%
	Validación de los marcadores moleculares	100%
	Diseño de primers para marcadores seleccionados	100%
Cuatro año	Elaboración de informe final y defensa de proyecto	100%
	Elaboración de artículo de difusión	