



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



FACULTAD DE
CIENCIAS
UDELAR | fcien.edu.uy



PEDECIBA



iibce
INSTITUTO DE
INVESTIGACIONES
BIOLÓGICAS
CLEMENTE
ESTABLE

Caracterización de *Escherichia coli* asociada a mortalidad de terneros en Uruguay

Magalí Andrea Fernández Trinidad

Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas

Facultad de Ciencias

Universidad de la República

Montevideo - Uruguay

28 de mayo de 2021



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



FACULTAD DE
CIENCIAS
UDELAR | fcien.edu.uy



PEDECIBA



Caracterización de *Escherichia coli* asociada a mortalidad de terneros en Uruguay

Tesis de Maestría presentada al Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas, como parte de los requisitos necesarios para la obtención del título de Magíster en Ciencias Biológicas

Director de tesis:

Dr. Pablo Zunino

Codirectora:

Dra. Ana Umpiérrez

Fernández Trinidad, Magalí Andrea

Caracterización de Escherichia coli asociada a mortalidad de terneros en Uruguay/ Magalí Andrea Fernández Trinidad. – Montevideo : Udelar. FC, 2021.

136 h. : cuadros, il., tablas ; 30 cm.

Director: Dr. Pablo Zunino.

Codirectora: Dra. Ana Umpiérrez.

Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas – Universidad de la República - PEDECIBA.

1.InPEC 2.ExPEC 3.Toxina Shiga 4.Virulencia 5.Resistencia antibiótica
6.Mortalidad

CDU 579.844(899)

Esta tesis de Maestría fue defendida el 28 de mayo de 2021 ante el Tribunal designado por la Comisión Directiva del Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA) en conjunto con el Consejo Científico del Área (CCA, Biología) y la Comisión de Posgrados. El mismo estuvo integrado por el Dr. Gustavo Varela, quien actuó como presidente del tribunal y los Dres. Silvia Batista y Rodrigo Puentes que oficiaron de vocales.

Agradecimientos

A Pablo Zunino, por haberme brindado la posibilidad de incorporarme a su laboratorio, de alcanzar un nivel más alto en mis estudios y de realizar esta tesis bajo su orientación.

A Ana Umpiérrez por hacerme parte de su equipo de trabajo, introducirme en la temática y orientarme en el día a día.

A los investigadores y técnicos veterinarios de INIA-La Estanzuela quienes recolectaron e identificaron todos los aislamientos de *E. coli* y nos los cedieron para su estudio. Todas las actividades se desarrollaron en el marco del proyecto “Estimación de la morbilidad y mortalidad de las enfermedades que afectan la cría de los terneros lecheros del Uruguay e identificación de los principales factores asociados a sus frecuencias” (PL-15),” desarrollado por dicha institución en colaboración con el Departamento de Microbiología del IIBCE (2015 - 2017). En especial, quiero agradecer a Martín Fraga, M^a Laura Casaux, Darío Caffarena, Carlos Schild, Federico Giannitti y Cecilia Monesiglio.

A Rafael Vignoli del Departamento de Bacteriología y Virología de la Facultad de Medicina, por permitirme realizar una pasantía en su laboratorio durante la cual aprendí nuevas técnicas que le sumaron muchísimo a esta tesis.

A Inés Bado por su orientación y por su colaboración en los ensayos de PFGE, susceptibilidad a antibióticos y mecanismos de resistencias transferibles.

A Nadia Cópola por colaborar con los ensayos y al resto de los integrantes del Depto. de Bacteriología y Virología, por recibirme tan amablemente en su lugar de trabajo.

A todos los compañeros del laboratorio que, en diferentes momentos y desde diferentes lugares, me han acompañado durante este proceso, han sabido responder a mis dudas y me brindaron una mano amiga cada vez que lo necesité: Fernanda, Andrea, Ana, Vicky, Sofía A., Martín, Deborah, Joaquín, Belén, Gabriela, Sofía, Karina, Claudia, Daniela, Paola, Loreley, Daniela, Guillermo, Joaquín, Majo, Florencia, Paula, Facundo y Nati.

A Lucía y Rodrigo por recordarme que se puede, cada vez que no le veía el fin.

A mi familia que siempre me apoya en mis emprendimientos.

A Lara.

Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AEEC	<i>Escherichia coli</i> de adherencia y borrado
AIEC	<i>Escherichia coli</i> adherente-invasiva
AK	Amikacina
AMC	Amoxicilina-ácido clavulánico
AMP	Ampicilina:
APEC	<i>Escherichia coli</i> patógena aviar
ARN	Ácido ribonucleico
ATCC	American-Type Culture Collection
BLEE	β -lactamasas de espectro extendido
CAZ	Ceftazidima
Cdt	Toxina de distensión citoletal
CH	Colitis hemorrágica
CIP	Ciprofloxacina
Cnf	Factor citotóxico necrotizante
CRO	Ceftriaxona
CXM	Cefuroxima
DAEC	<i>Escherichia coli</i> de adherencia difusa
DEC	<i>Escherichia coli</i> diarreogénica
EAEC	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva
ENR	Enrofloxacin
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatógena
ERIC-PCR	<i>Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus PCR</i>
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica
ExPEC	<i>Escherichia coli</i> patógena extraintestinal
FEP	Cefepime
FV	Factores de virulencia
Gb3	Globotriaosylceramida 3
GEN	Gentamicina
InPEC	<i>Escherichia coli</i> patógena intestinal
ITU	Infecciones del tracto urinario
LEE	<i>Locus of Enterocyte Effacement</i>
MLST	<i>Multilocus sequence typing</i>
NAL	Ácido nalidíxico
NTEC	<i>Escherichia coli</i> necrotoxigénica
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PFGE	<i>Pulsed-field gel electrophoresis</i>
PMQR	<i>Plasmid-mediated quinolone-resistance</i>
Rep-PCR	<i>Repetitive element sequence PCR</i>
SEPEC	<i>Escherichia coli</i> septicémica

STEC	<i>Escherichia coli</i> productora de Toxina Shiga
STR	Estreptomicina
SUH	Síndrome Urémico Hemolítico
SXT	Trimetoprim-sulfametoxazol
TOB	Tobramicina
UPEC	<i>Escherichia coli</i> uropatogénica
UPGMA	<i>Unweighted pair group method with arithmetic mean</i>
VTEC	<i>Escherichia coli</i> productora de verotoxinas

Resumen

En Uruguay, la mortalidad de terneros en producción ocasiona importantes pérdidas económicas. La mayoría de las muertes ocurren a causa de enfermedades infectocontagiosas. *Escherichia coli* es habitante natural de la microbiota intestinal y, en ocasiones, es capaz de causar infección intestinal y extraintestinal. El objetivo de esta tesis fue caracterizar aislamientos de *E. coli* de muestras intestinales y extraintestinales de terneros neonatos muertos. Asimismo, en algunos establecimientos, se estudiaron aislamientos intestinales de animales vivos donde existían casos de mortalidad.

Mediante PCR, se buscaron genes de virulencia característicos de *E. coli* patogénica y se evaluó la diversidad intraespecífica utilizando *rep*-PCR. A los aislamientos caracterizados como NTEC, STEC y EPEC, se les asignó filogrupo, serogrupo y, cuando correspondió, el subtipo Stx. Además, en este subgrupo de aislamientos, se estudió la sensibilidad a los antimicrobianos y la presencia de genes plasmídicos asociados a resistencia (PMQR) mediante disco difusión en agar y PCR, respectivamente. Finalmente, se infirieron relaciones clonales utilizando PFGE.

En animales muertos, se identificaron genes característicos de los virotipos NTEC, EPEC y STEC. La prevalencia de los genes *iucD*, *afa8E*, *f17* y *papC*, fue elevada tanto en el ambiente intestinal como extraintestinal y no se detectó *f5*, *f41*, *saa*, *sfaDE*, *cdtIV*, *lt*, *stx1* y *stx2*. Por otro lado, los aislamientos con genotipo *stx1*, *eae* y *ehxA* (STEC LEE+) se identificaron con mayor frecuencia en el ambiente intestinal respecto al extraintestinal de los animales muertos (OR = 8,25; IC 95 %, 1,15 - 59,01; OR = 12,83; IC 95 %, 1,69 - 97,20 y OR = 7,78; IC 95 %, 1,20 - 50,43, respectivamente). En los animales vivos, se detectó el mismo conjunto de genes que en los muertos, no obstante, la prevalencia de *stx1*, *eae* y *ehxA* en el intestino de los animales muertos fue mayor (OR = 21; IC 95 %, 1,92 - 229,40; OR = 15,17; IC 95 %, 2,03 - 113,35 y OR = 15,17; IC 95 %, 2,03 - 113,35, respectivamente). Estos resultados sugieren que la presencia de este genotipo en el intestino de los terneros podría aumentar la probabilidad de muerte de los animales.

La diversidad intraespecífica, observada mediante *rep*-PCR, en los aislamientos NTEC, EPEC y STEC no pudo atribuirse al perfil de virulencia, ni al origen geográfico de los aislamientos. Los recuperados de animales muertos se asignaron a los filogrupos A, B1, D y E y pertenecieron al serogrupo O111, o no pudieron ser tipificables. Mientras que los

provenientes de animales vivos pertenecieron a los filogrupos B1 y E, y a los serogrupos O26 y O111. En las STEC, se determinaron los subtipos Stx1a y Stx1c. En cuanto a los estudios de resistencia a antimicrobianos, todos los aislamientos asociados a mortalidad fueron multirresistentes y la mayoría portaron genes *qnrB*. En particular se evidenció la circulación de la variante *qnrB19*. Finalmente, el PFGE mostró la circulación de cepas diferentes, procedentes de diversos orígenes, con similares perfiles genéticos, evidenciando la movilidad de algunos genes característicos de los virotipos.

Mediante la comparación de la frecuencia de los genes estudiados en los animales muertos y en trabajos anteriores realizados en animales vivos de nuestro país, se puede especular que los genes *stx1*, *eae* y *ehxA* podrían tener un rol importante en la mortalidad (OR = 11,85; IC 95 %, 4,19 - 33,52; OR = 9,75; IC 95 %, 4,05 - 23,49 y OR = 18,02; IC 95 %, 6,65 - 48,84, respectivamente). Adicionalmente, la mayor prevalencia de los genes *afa8E*, *f17G1* y *papC* en los animales muertos, también podría sugerir su contribución al deterioro de la salud de los terneros (OR = 2,59; IC 95 %, 1,49 - 4,59; OR = 1,89; IC 95 %, 1,08 - 3,32 y OR = 6,70; IC 95 %, 1,93 - 23,20, respectivamente). Sin embargo, otros factores como la dieta, el manejo de los animales y la infección por otros patógenos, pueden influir en la muerte. Más estudios serán necesarios para poder desarrollar estrategias efectivas de prevención y de control de la mortalidad de los bovinos.

Asimismo, los resultados de esta tesis dejan al descubierto que existen aislamientos multirresistentes en terneros muertos. La multirresistencia desafía el tratamiento de las enfermedades y aumenta el riesgo de muerte, al tiempo que la potencial transmisibilidad de los genes a otras especies, constituye una amenaza para la salud pública.

Palabras clave: InPEC, ExPEC, toxina Shiga, virulencia, resistencia antibiótica, mortalidad

Abstract

In Uruguay, the mortality of calves in production causes significant economic losses. Most deaths occur from infectious diseases. *Escherichia coli* is a natural inhabitant of the intestinal microbiota and is sometimes capable of causing intestinal and extraintestinal infection. The objective of this thesis was to characterize isolates of *E. coli* from intestinal and extraintestinal samples of dead neonatal calves. Likewise, in some establishments, intestinal isolates from live animals where there were cases of mortality were studied.

By PCR, characteristic virulence genes of pathogenic *E. coli* were searched and intraspecific diversity was evaluated using *rep*-PCR. Isolates characterized as NTEC, STEC and EPEC were assigned phylogroup, serogroup and, when appropriate, the Stx subtype. Furthermore, in this subgroup of isolates, antimicrobial sensitivity and the presence of plasmid genes associated with resistance (PMQR) were studied by means of agar diffusion disk and PCR, respectively. Finally, clonal relationships were inferred using PFGE.

In dead animals, characteristic genes of the NTEC, EPEC and STEC pathotypes were identified. The prevalence of the genes *iucD*, *afa8E*, *f17*, and *papC* was high both in the intestinal and extraintestinal environments, and *f5*, *f41*, *saa*, *sfaDE*, *cdtIV*, *lt*, *sta*, and *stx2* were not detected. On the other hand, isolates with genotype *stx1*, *eae* and *ehxA* (STEC LEE +) were more frequently identified in the intestinal environment than in the extraintestinal environment of dead animals (OR = 8.25; 95% CI, 1.15 - 59.01; OR = 12.83; 95% CI, 1.69 - 97.20 and OR = 7.78; 95% CI, 1.20 - 50.43, respectively). In living animals, the same set of genes was detected as in dead animals, however the prevalence of *stx1*, *eae* and *ehxA* in the intestine of dead animals was higher (OR = 21; 95% CI, 1.92 - 229.40; OR = 15.17; 95% CI, 2.03 - 113.35 and OR = 15.17; 95% CI, 2.03 - 113.35, respectively). These results suggest that the presence of this genotype in the intestine of calves could increase the probability of death of the animals.

The intraspecific diversity, observed by *rep*-PCR, in the NTEC, EPEC and STEC isolates could not be attributed to the virulence profile, nor to the geographic origin of the isolates. Those recovered from dead animals were assigned to phylogroups A, B1, D and E and belonged to serogroup O111, or could not be typed. While those from live animals belonged to phylogroups B1 and E, and to serogroups O26 and O111. In STEC, the

subtypes Stx1a and Stx1c were determined. Regarding antimicrobial resistance studies, all isolates associated with mortality were multi-resistant and most carried *qnrB* genes. In particular, the circulation of the *qnrB19* variant was evidenced. Finally, the PFGE showed the circulation of different strains, coming from different origins, with similar genetic virulence profiles, evidencing the mobility of some characteristic genes of the pathotypes.

By comparing the frequency of the genes studied in dead animals and in previous work carried out in live animals in our country, it can be speculated that the genes *stx1*, *eae* and *ehxA* could have an important role in mortality (OR = 11, 85; 95% CI, 4.19 - 33.52; OR = 9.75; 95% CI, 4.05 - 23.49 and OR = 18.02; 95% CI, 6.65 - 48.84, respectively). Additionally, the higher prevalence of the *afa8E*, *f17G1* and *papC* genes in dead animals could also suggest their contribution to the deterioration of calf health (OR = 2.59; 95% CI, 1.49 - 4.59; OR = 1.89; 95% CI, 1.08 - 3.32 and OR = 6.70; 95% CI, 1.93 - 23.20, respectively). However, other factors such as diet, handling of animals and infection by other pathogens, can influence death. More studies will be needed in order to develop effective strategies for the prevention and control of bovine mortality. Likewise, the results of this thesis reveal that there are multiresistant isolates in dead calves. Multi-resistance challenges disease treatment and increases the risk of death, while the potential transmissibility of genes to other species constitutes a threat to public health.

Key words: InPEC, ExPEC, Shiga toxin, virulence, antibiotic resistance, lethality

Lista de Tablas

Tabla 2.1 Características del muestreo de terneros muertos	46
Tabla 2.2 Procedencia de aislamientos de <i>E. coli</i> recuperados de terneros muertos.....	47
Tabla 2.3 Procedencia de los aislamientos provenientes de animales vivos	48
Tabla 2.4 Cebadores utilizados en las PCR simples.....	50
Tabla 2.5 Cebadores utilizados en multiplex PCR	51
Tabla 2.6 Cebadores utilizados en Rep-PCR	53
Tabla 2.7 Cebadores utilizados para subtipificación de stx1.....	55
Tabla 2.8 Cebadores utilizados para la asignación de grupo filogenético.....	56
Tabla 2.9 Cebadores utilizados para identificación de serogrupo	57
Tabla 2.10 Cebadores para identificación de genes plasmídicos asociados a resistencia a quinolonas.....	59
Tabla 3.1 Diversidad de genes de virulencia y muestras biológicas en animales muertos	65
Tabla 3.2 Perfiles de virulencia en animales muertos (n = 17)	68
Tabla 3.3 Perfiles de virulencia identificados en MF de animales vivos (n = 15)	70
Tabla 3.4 Genes de virulencia identificados en animales muertos y vivos que convivían en un mismo establecimiento	73
Tabla 3.5 Diversidad de los aislamientos recuperados en los Departamentos	76
Tabla 3.6 Diversidad genética de aislamientos recuperados de diferentes ambientes ...	77
Tabla 3.7 Diversidad genética de los aislamientos en los animales	77
Tabla 3.8 Origen de los clones	77
Tabla 3.9 Origen y perfil genético de virulencia de los aislamientos seleccionados	78
Tabla 3.10 Caracterización molecular de los aislamientos STEC, EPEC y NTEC seleccionados	79
Tabla 3.11 Perfiles de resistencia a los antimicrobianos	82
Tabla 3.12 Variantes genéticas identificadas mediante PFGE	83
Tabla 3.13 Diversidad genética en los virotipos.....	85
Tabla 7.1 Perfiles únicos de virulencia en aislamientos recuperados de animales muertos (n = 17)	106
Tabla 7.2 Perfiles únicos de virulencia en aislamientos recuperados de animales vivos	108

Lista de Figuras

Figura 1.1 Productores con lechería comercial por sección policial. Año agrícola 2018 - 2019.....	18
Figura 1.2 Intensificación de la producción lechera en Uruguay	19
Figura 1.3 Lesión de adherencia y borrado provocada por EPEC.....	30
Figura 2.1 Selección de aislamientos de <i>E. coli</i> con perfiles únicos de virulencia	52
Figura 2.2 Selección de perfiles únicos de virulencia con genes característicos de virotipos de <i>E. coli</i>	54
Figura 3.1 Productos de amplificación de secuencias parciales de genes de virulencia	62
Figura 3.2 Cantidad de genes de virulencia identificados en animales muertos (n = 17)	63
Figura 3.3 Frecuencia de ocurrencia de genes de virulencia de <i>E. coli</i> en animales muertos (n = 17)	64
Figura 3.4 Comparación de la frecuencia de genes de virulencia en el ambiente intestinal (n = 10) y extraintestinal (n = 13) de animales muertos	66
Figura 3.5 Cantidad de genes de virulencia identificados en animales vivos (n = 15) ..	69
Figura 3.6 Cantidad de genes identificados en todos los animales	71
Figura 3.7 Frecuencia de genes de virulencia en animales vivos y muertos (n = 32)	72
Figura 3.8 Dendograma de los aislamientos del departamento de Colonia (n = 61).....	74
Figura 3.9 Dendograma de los aislamientos del departamento de Canelones (n = 3)....	75
Figura 3.10 Dendograma de los aislamientos del departamento de San José (n = 14) ..	75
Figura 3.11 Dendograma de los aislamientos del departamento de Río Negro (n = 7) .	75
Figura 3.12 Frecuencia de detección de aislamientos resistentes a los antimicrobianos (n = 25).....	81
Figura 3.13 Dendograma generado con los perfiles de bandas obtenidos por PFGE	83
Figura 8.1 . Dendograma de toda la selección de aislamientos.....	110

Tabla de contenidos

Agradecimientos	6
Abreviaturas	7
Resumen	9
Abstract	11
Lista de Tablas	13
Lista de Figuras	14
Tabla de contenidos	14
1 Introducción.....	18
1.1 Producción de leche en Uruguay	18
1.2 Principales enfermedades infecciosas vinculadas a mortalidad del ganado	19
1.2.1 DNT	20
1.2.2 Neumonía	20
1.2.3 Septicemia	20
1.3 Generalidades de <i>E. coli</i>	21
1.4 Clasificación de <i>E. coli</i>	21
1.4.1 Cepas comensales	22
1.4.2 <i>E. coli</i> patogénica	23
1.5 Factores de virulencia de <i>E. coli</i>	26
1.5.1 Adhesinas	26
1.5.2 Toxinas	30
1.5.3 Mecanismos de captación de hierro.....	33
1.6 Clasificación en virotipos	34
1.7 Grupos filogenéticos de <i>E. coli</i>	37
1.8 Serotipificación	38
1.9 Genotipado	39

1.9.1	<i>Rep</i> -PCR	39
1.9.2	Electroforesis en gel de campo pulsado (<i>Pulsed-field gel electrophoresis</i> , PFGE)	40
1.10	Resistencia a los antimicrobianos	40
1.10.1	Principales grupos de antimicrobianos y mecanismos de resistencia de <i>E. coli</i>	41
1.11	Hipótesis	44
1.12	Objetivo general.....	44
1.13	Objetivos específicos	44
2	Metodología.....	45
2.1	Procedencia de los aislamientos de <i>E. coli</i>	45
2.1.1	Aislamientos provenientes de terneros muertos	45
2.1.2	Aislamientos provenientes de terneros vivos	46
2.1.3	Nomenclatura de los aislamientos	46
2.2	Extracción de ADN genómico	48
2.3	Identificación de genes asociados a virulencia	48
2.3.1	Identificación de genes mediante PCR.....	49
2.3.2	Identificación de genes mediante multiplex PCR.....	50
2.3.3	Visualización de los amplicones.....	52
2.4	Selección de aislamientos con perfiles de virulencia únicos	52
2.4.1	<i>Rep</i> -PCR y patrones fingerprinting	53
2.5	Selección de aislamientos con perfiles de virulencia característicos.....	54
2.5.1	Subtipificación de Stx.....	54
2.5.2	Asignación de grupo filogenético.....	55
2.5.3	Asignación de serogrupo	56
2.5.4	Resistencia a los antimicrobianos de uso común en la clínica veterinaria	57
2.5.5	Tipificación molecular mediante PFGE	59

2.6	Análisis estadísticos	61
3	Presentación de resultados	62
3.1	Puesta a punto de reacciones de PCR	62
3.2	Detección e identificación de genes de virulencia en <i>E. coli</i>	63
3.2.1	Ocurrencia y diversidad de genes de virulencia en animales muertos	63
3.2.2	Ocurrencia de genes de virulencia en animales vivos	67
3.2.3	Establecimientos con muestreo de animales muertos y vivos.....	71
3.3	Selección de aislamientos con perfiles de virulencia únicos	73
3.3.1	Diversidad intraespecífica de la colección	74
3.4	Selección de aislamientos con perfiles de virulencia característicos ($n = 25$). 78	
3.4.1	Tipificación de Stx1	79
3.4.2	Asignación de grupo filogenético.....	80
3.4.3	Determinación de serogrupo.....	80
3.4.4	Resistencia a antibióticos y búsqueda de PMQR	80
3.4.5	Resistencia a quinolonas.....	82
3.4.6	Tipificación molecular mediante PFGE	83
4	Discusión	86
5	Conclusiones	102
6	Perspectivas.....	105
7	Anexo A. Perfiles genéticos de virulencia.....	106
8	Anexo B Dendograma generado por ERIC- PCR.....	110
9	Bibliografía	111

1 Introducción

1.1 Producción de leche en Uruguay

La producción de leche en Uruguay supera los 2000 millones de litros anualmente. Aproximadamente, el 85 % de esta producción se remite a plantas industriales y el 15 % se destina a elaboración de productos artesanales y, en menor medida, al consumo dentro del predio. El país cuenta con 3423 establecimientos productores de leche, distribuidos en 761 mil hectáreas. La mayoría de los productores se ubican en el sur del país: San José, Colonia, Florida, Canelones y Soriano (

Figura 1.1) (Oficina de estadísticas agropecuarias (DIEA)/ Ministerio de ganadería agricultura y pesca (MGAP) 2020).

En los últimos años, se ha incrementado la práctica de ganadería intensiva, la cual se sustenta en el confinamiento de los animales para lograr un uso más eficiente de los recursos naturales y aumentar la productividad por unidad de superficie (Figura 1.2). La condición de confinamiento y el estrés que sufren los animales bajo estos sistemas de producción, promueven la propagación de enfermedades infectocontagiosas poniendo en riesgo la sostenibilidad del negocio (Lorenz, Fagan, y More 2011).

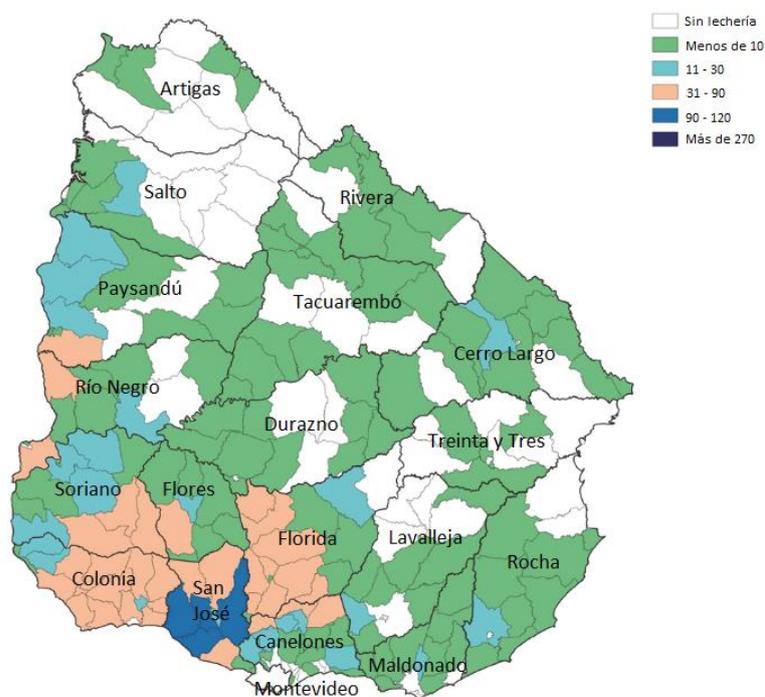


Figura 1.1 Productores con lechería comercial por sección policial. Año agrícola 2018 - 2019.

Tomado de: Oficina de estadísticas agropecuarias (DIEA)/ Ministerio de ganadería agricultura y pesca (MGAP) 2020.

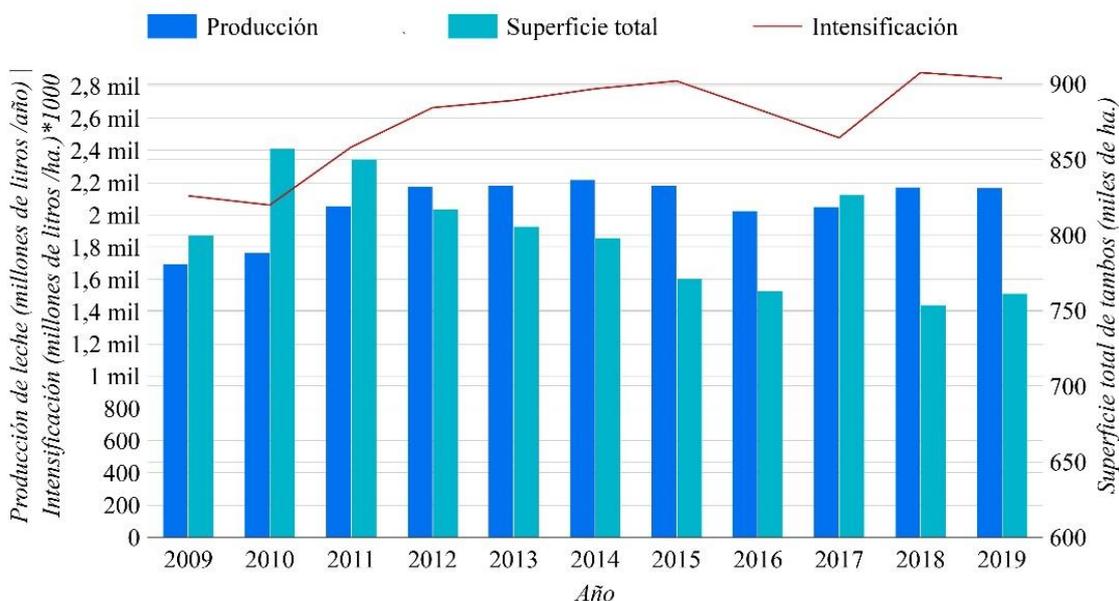


Figura 1.2 Intensificación de la producción lechera en Uruguay

Fuente: Oficina de estadísticas agropecuarias (DIEA)/ Ministerio de ganadería agricultura y pesca (MGAP) 2017; 2020.

Es bien sabido que las enfermedades de los terneros tienen un impacto económico negativo en los sistemas de producción ganadera (Donovan et al. 1998). Aunque la muerte de los animales es la principal preocupación, la morbilidad del ganado puede costar incluso más que la mortalidad cuando se consideran los gastos asociados al tratamiento médico, la mano de obra involucrada, el sacrificio prematuro debido a condiciones crónicas y la disminución del rendimiento durante y después de una enfermedad (Smith 1998).

1.2 Principales enfermedades infecciosas vinculadas a mortalidad del ganado

Un estudio reciente, ha revelado que las tasas de mortalidad de los animales en edad perinatal y en crianza de establecimientos lecheros de Uruguay, superan las reportados para Argentina, Estados Unidos y Francia. Además, se conoció que la mayoría de las muertes ocurren en los primeros 21 días de vida y se asocian principalmente a enfermedades infecciosas (Schild 2017).

Algunas de las enfermedades infecciosas más comunes que pueden ocasionar la muerte de los terneros en producción son la diarrea neonatal en terneros (DNT), la neumonía y la sepsis (Lorenz, Fagan y More 2011; Fecteau et al. 2001).

1.2.1 DNT

La DNT es reconocida mundialmente como uno de los mayores desafíos para las industria cárnica y lechera (Lorenz, Fagan y More 2011). Es una enfermedad multifactorial cuyos agentes etiológicos más comúnmente asociados son *E. coli*, rota y coronavirus, *Cryptosporidium* spp., *Clostridium* spp., y *Salmonella* spp. (Foster y Smith 2009; Kolenda, Burdukiewicz y Schierack 2015). Distintos estudios han demostrado que la DNT es la causa más común de morbilidad y mortandad entre terneros recién nacidos (entre 12 hs y 35 días de vida) por lo que se reconoce como uno de los mayores desafíos que enfrenta la industria cárnica y lechera a nivel mundial (Margueritte et al. 2007; Lorenz, Fagan y More 2011).

1.2.2 Neumonía

La neumonía puede provocar daño pulmonar extenso y, en ocasiones, la muerte. Con una amplia gama de agentes etiológicos implicados, los virus, como el sincitial respiratorio bovino (BRSV) y el virus de la parainfluenza tipo 3 (virus PI-3), se reconocen como agentes primarios. Sin embargo, la infección primaria puede predisponer al animal a sufrir invasiones secundarias del tracto respiratorio inferior por otros tipos de agentes como, por ejemplo, las bacterias (Ames 1997; Bryson 1985). Dentro de los agentes bacterianos asociados a neumonía, se ha identificado a *Pasteurella multocida*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *E. coli*, entre otros (Ames 1997; Choudhary et al. 2019).

1.2.3 Septicemia

La septicemia es una enfermedad sistémica asociada a la presencia y persistencia de microorganismos patógenos o sus toxinas en la sangre (Fecteau et al., 2009). *E. coli* ha sido ampliamente identificada como responsable de septicemia y mortalidad neonatal en terneros lecheros (Fecteau, Smith y George 2009; Kolenda, Burdukiewicz y Schierack 2015; Peek et al. 2018). La septicemia causada por *E. coli* ocurre con mayor frecuencia antes de los 14 días de edad y su inicio se asocia a la exposición a grandes cantidades de este microorganismo, como puede ocurrir en las áreas de parto (Peek et al. 2018). Muchos

grupos de *E. coli* pueden ser invasivos oportunistas capaces de causar infección y septicemia en terneros neonatales (Fecteau, Smith y George 2009). Los animales infectados pueden eliminarla en la orina, las secreciones orales, secreciones nasales y en las heces. Clínicamente, los terneros septicémicos presentan signos de depresión, debilidad, taquicardia y deshidratación (Peek et al. 2018).

1.3 Generalidades de *E. coli*

E. coli es un bacilo Gram negativo, perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae* de la clase de *Gammaproteobacteria* (Mainil 2013). El tamaño del genoma oscila entre 4,6 y 5,9 millones de pares de bases (Mpb) y se clasifica en central y accesorio (Robins-Browne et al. 2016). Cada cepa de *E. coli* transporta entre 4200 y 5500 genes, de los cuales menos de 1500 conforman el genoma central, mientras que los restantes forman parte del genoma flexible. El genoma central se define por aquellos genes presentes en todas las cepas de una especie bacteriana, son los genes esenciales para la vida (*housekeeping*) e incluyen aquellos involucrados en la replicación, transcripción y traducción, entre otros. Por otro lado, el genoma accesorio o flexible comprende los genes responsables de diversos fenotipos y adaptaciones a condiciones ambientales específicas en una población o especie. El genoma flexible incluye a los bacteriófagos, determinantes de virulencia, resistencia adquirida a los antimicrobianos, entre otros. Estos se diseminan por transferencia horizontal de genes (THG) contenidos en elementos genéticos móviles como los plásmidos, bacteriófagos, islas de patogenicidad y transposones (Leimbach, Hacker y Dobrindt 2013). Esta plasticidad genética permite múltiples combinaciones de genes que dan como resultado la diversificación fenotípica y rápida adaptación a variaciones en las condiciones ambientales. De esta manera puede conducir la aparición de nuevas cepas hipervirulentas que combinan genes de resistencia y virulencia (Mellmann et al. 2011; Leimbach, Hacker y Dobrindt 2013).

1.4 Clasificación de *E. coli*

Se pueden distinguir dos grandes grupos de *E. coli*: las comensales no patógenas, que pertenecen a la microbiota intestinal normal de humanos y animales de sangre caliente y las variantes patogénicas que causan diversos tipos de infecciones. Dentro de este último se distinguen las variantes que causan enfermedad intestinal (InPEC) y las que causan infecciones extraintestinales (ExPEC) (Köhler y Dobrindt 2011).

1.4.1 Cepas comensales

La mayoría de las cepas de *E. coli* son miembros comensales de la microbiota del tracto intestinal de animales vertebrados de sangre caliente (Mainil 2013; Fratamico et al. 2016; Robins-Browne et al. 2016). No obstante, la elevada capacidad de adaptación de *E. coli* le permite sobrevivir durante largos períodos sin crecimiento y en una variedad de nichos como el suelo, el agua, los alimentos y los sedimentos (Leimbach, Hacker y Dobrindt 2013). *E. coli* persiste en el medio ambiente hasta que su próximo huésped consume bacterias viables en agua o alimentos contaminados. Después de la ingestión, *E. coli* entra en fase estacionaria donde, mediante mecanismos de protección, es capaz de sobrevivir a la acidez del estómago. Al llegar al colon, *E. coli* debe encontrar los nutrientes necesarios para multiplicarse. La colonización exitosa del colon depende de la competencia por los nutrientes con el resto de la microbiota, la penetración de la capa de mucus y la capacidad para evitar las defensas del huésped y crecer rápidamente, superando la tasa de renovación del mucus. *E. coli* reside en dicha capa hasta que se desprende en el lumen del intestino, desde donde se eliminan algunas células en las heces del huésped y el ciclo comienza de nuevo (Conway y Cohen 2015).

E. coli es una de las primeras especies bacterianas en colonizar el intestino humano, alcanzando una densidad poblacional muy alta, incluso antes de la expansión de los anaerobios (Tenaillon et al. 2010). Los efectos beneficiosos de las bacterias comensales están relacionados con mejorar la función de la barrera intestinal, la modulación de la respuesta inmunitaria, el establecimiento de una microbiota sana y la inhibición de la colonización intestinal por patógenos. Las bacterias presentes en las mucosas estimulan el desarrollo del sistema inmunológico innato tanto como del adaptativo (Gomez et al. 2019). En este sentido, no son las bacterias de forma aislada quienes contribuyen al desarrollo del sistema inmunitario, sino que son las proporciones bacterianas durante la transición en el establecimiento y la evolución del microbioma que promueven una tolerancia inmunitaria beneficiosa o perjudicial (Taschuk y Griebel 2012). La alteración de la microbiota comensal podría conducir a un aumento de la permeabilidad intestinal, translocación bacteriana, inflamación crónica o respuesta exacerbada y a la aparición de enfermedad local o sistémica (Gomez et al. 2019).

En general, las cepas de *E. coli* coexisten con el hospedero sin causar ningún daño y rara vez causan enfermedad, salvo cuando éste se encuentra inmunocomprometido o la barrera

de la mucosa gastrointestinal ha sido dañada (Kaper, Nataro y Mobley 2004). Sin embargo, algunas variantes de *E. coli* han adquirido atributos de virulencia que les permiten adaptarse a otros nichos y causar enfermedad tanto a nivel intestinal como extraintestinal (Kaper, Nataro y Mobley 2004; Tenaillon et al. 2010; Peek et al. 2018; Robins-Browne et al. 2016). La capacidad de un microorganismo de adherirse e invadir los tejidos del huésped, producir toxinas y sobrevivir a los mecanismos de defensa y otras condiciones ambientales adversas se reconocen como potenciales factores de virulencia (FV) (Gilles Fecteau, Smith y George 2009). No obstante, en ocasiones, estos factores asociados a virulencia pueden contribuir a la supervivencia en el medio ambiente o al comensalismo en otros huéspedes (Tenaillon et al. 2010). En efecto, en hospederos sanos de una misma especie, se han identificado aislamientos con reconocidos genes de virulencia de *E. coli* patogénica (Madoshi et al. 2016; Umpiérrez et al. 2020).

1.4.2 *E. coli* patogénica

La plasticidad del genoma ha llevado a la evolución de *E. coli* a cepas patógenas capaces de provocar diversas enfermedades en los seres humanos y en los animales. Tradicionalmente, *E. coli* se subdivide en varios grupos patogénicos que provocan diferentes infecciones y patologías intestinales y extraintestinales (Mainil 2013). Varios de estos grupos patógenos se han nombrado por el síndrome clínico que producen, como *E. coli* diarreogénica (DEC), *E. coli* uropatógena (UPEC), *E. coli* septicémica (SePEC), *E. coli* asociada a meningitis neonatal (NMEC), etc., o según el huésped objetivo, como *E. coli* patógena aviar (APEC) (Mainil 2013). Más tarde, se nombraron sobre la base de sus propiedades de adherencia y/o propiedades tóxicas: *E. coli* de adherencia y borrado (AEEC), *E. coli* de adherencia difusa (DAEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* productora de toxina Shiga/Vero (STEC/VTEC), *E. coli* necrotoxigénica (NTEC), entre otras. Actualmente, algunos nombres ya no se utilizan, mientras otros parecen continuar vigentes. Finalmente, algunas cepas han recibido nombres diferentes en función de la presencia, o ausencia, de un conjunto específico de genes de virulencia y las características de la enfermedad que causan (Mainil 2013; Fratamico et al. 2016).

Como se mencionó anteriormente, todas las *E. coli* patogénicas se dividen en dos grandes grupos según el lugar donde se desarrolle la infección: InPEC y ExPEC (Köhler y Dobrindt 2011).

1.4.2.1 Grupo ExPEC

El grupo de cepas *E. coli* que causa infecciones fuera del tracto intestinal se conoce como ExPEC. Estas cepas son capaces de colonizar de manera eficiente y causar diversas infecciones intrabdominales, infecciones del tracto urinario (ITU), septicemia o meningitis, neumonía, infección de dispositivos intravasculares, osteomielitis e infección de tejidos blandos (Russo y Johnson 2000). Las más conocidas de las ExPEC son las UPEC, NMEC y SePEC (Russo y Johnson 2000; 2003; 2004; Smith, Fratamico y Gunther 2007; Pettersen et al. 2016). El grupo ExPEC es parte de la microbiota intestinal de la población sana y normalmente coloniza el intestino de forma asintomática (Köhler y Dobrindt 2011). Las cepas comensales intestinales de *E. coli* hacen de reservorio y son la principal fuente que da lugar a infecciones extraintestinales (Manges et al. 2019). Mientras que las InPEC son a menudo epidemiológica y filogenéticamente distintas de las ExPEC y cepas comensales no patógenas, muchas ExPEC y *E. coli* no patógenas comparten grandes fracciones de sus genomas centrales, y en algunos linajes son indistinguibles (Köhler y Dobrindt 2011; Manges et al. 2019). Sin embargo, se acepta que algunos linajes resultan más exitosos en la colonización extraintestinal (Manges et al. 2019).

Se ha propuesto que la virulencia extraintestinal es un proceso multigénico con un conjunto común de determinantes de virulencia que abarcan genes implicados en la adhesión y colonización del epitelio, en la evasión de la respuesta inmune del hospedero y en el metabolismo bacteriano (Le Gall et al. 2007). Las cepas ExPEC fueron definidas primeramente por Johnson y colaboradores (2003) como aquellas que contienen 2 o más de los siguientes marcadores de virulencia: *papA* (subunidad estructural de fimbrias P) y/o *papC* (fimbrias P), *sfa/foc* (fimbrias S y F1C), *afa/dra* (adhesinas de unión al antígeno Dr), *kpsMT II* (unidades de polisacárido capsular del grupo 2) e *iutA* (receptor de aerobactina), entre otros (Johnson et al. 2003). Años más tarde, los mismos autores proponen una lista considerablemente mayor de genes asociados epidemiológica y/o experimentalmente a la virulencia de las cepas ExPEC (Johnson y Russo 2018). En adición a los genes antes mencionados, varios trabajos han reportado la presencia de genes codificantes para hemolisinas, adhesinas CS31A y F17, Toxinas de distensión citoletal (Cdt) y Factor citotóxico necrotizante (Cnf), entre otros (Gérardin et al. 2000; Fecteau et al. 2001; Sigrid Van Bost et al. 2001; Girardeau et al. 2003; Ghanbarpour y Oswald 2010; Ghanbarpour y Nazem 2010; Louge 2016; Johnson y Russo 2018). No

obstante, muchos de estos determinantes también se consideran factores de colonización y supervivencia en el entorno intestinal normal y con enfermedad, y por lo tanto se relacionan con el comensalismo y con algunas enfermedades, como lo son la fimbria F17 y la DNT (Le Gall et al. 2007b; Kolenda, Burdukiewicz, y Schierack 2015). La clasificación ExPEC también se ha propuesto sobre la base del sitio de aislamiento y la detección de dos genes asociados a virulencia, tanto como a la pertenencia a un linaje ExPEC principal (Russo y Johnson 2004; Manges et al. 2019). A pesar de la sobrerrepresentación de muchos genes en las ExPEC en algunos linajes que causan infección, todavía existe incertidumbre acerca de lo que las define o diferencia de las cepas comensales (Manges et al. 2019). Si bien se han descrito varios FV importantes y su papel durante la patogenia, las ExPEC no pueden distinguirse inequívocamente basándose en un conjunto de estos (Köhler y Dobrindt 2011; Manges et al. 2019). Más aún, no se han encontrado diferencias significativas en términos de distribución o contenido de FV entre las cepas comensales y bacteriémicas de origen intestinal (Clermont et al. 2017).

Finalmente, a diferencia de las DEC, en donde la mayoría de los virotipos se definen por la presencia de uno o más marcadores de virulencia específicos y, a veces, por la ausencia de otros, en ExPEC no hay determinantes de virulencia específicos que definan exclusivamente cada subtipo (Robins-Browne et al. 2016).

1.4.2.2 *E. coli* patogénica intestinal

Las cepas InPEC se relacionan con enfermedad diarreica y se subdividen según sus determinantes de virulencia, mecanismos de infección, interacción con el enterocito, tropismo tisular, o los síntomas y síndromes que ocasionan (Robins-Browne et al. 2016). Dentro de las InPEC existen 6 pato-virotipos bien conocidos: *E. coli* enteropatógena (EPEC), STEC o VTEC (incluida *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), EAEC, DAEC y *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) (Kaper, Nataro y Mobley 2004; Croxen y Finlay 2010; Mainil 2013; Scheutz 2014). Otros, como NTEC y *E. coli* adherente-invasiva (AIEC), también se asocian con enfermedad intestinal (Mainil 2013; Rojas-Lopez et al. 2018).

1.5 Factores de virulencia de *E. coli*

Como se mencionó anteriormente, los FV de un microorganismo refieren a su capacidad para adherirse e invadir los tejidos del huésped, producir toxinas y evadir la respuesta inmune y otras condiciones adversas (Gilles Fecteau, Smith y George 2009). Los diferentes factores se agrupan por categorías funcionales: las adhesinas (fimbriales y no fimbriales), sistemas sideróforos, toxinas, polisacáridos de superficie, invasinas y factores de resistencia sérica, entre otros (Johnson y Russo 2018). A continuación, se profundiza en los determinantes de virulencia de *E. coli* que fueron objeto de estudio y se utilizaron para su clasificación en virotipos o grupo ExPEC.

1.5.1 Adhesinas

La capacidad de las bacterias para adherirse a las células del huésped es un requisito previo para el proceso de colonización e invasión microbiana. La unión de las bacterias patógenas a los receptores del hospedero suele estar mediada por adhesinas fimbriales o afimbriales. Las fimbrias (o pili) son complejos de moléculas unidas por enlace no covalente que se producen en la superficie de la célula bacteriana. La mayoría de las fimbrias están compuestas por la misma subunidad estructural repetida y una subunidad de adhesina específica que media el reconocimiento del receptor del huésped. La subunidad de adhesina generalmente se ubica en la parte superior o dentro de la estructura fimbrial, por lo que se presenta alejada de la superficie de la célula bacteriana. En aislamientos patógenos de animales y humanos también se ha identificado otro grupo de adhesinas no asociadas con fimbrias (o afimbriales) (Le Bouguéneq y Bertin 1999).

1.5.1.1 Fimbrias F5 y F41

Ambas adhesinas son fimbriales e intervienen en la colonización de las células epiteliales del intestino delgado bovino. Los aislamientos positivos se han asociado frecuentemente al pato-virotipo ETEC y animales con síntomas de diarrea (Mainil et al. 1998; Nagy y Zs Fekete 1999; Kolenda, Burdukiewicz y Schierack 2015). Asimismo, estos aislamientos se han recuperado fundamentalmente de terneros de 1 a 7 días de edad, lo que posiblemente se deba a la disminución de los receptores para F5 observada en terneros de mayor edad (Nagy y Fekete 2005). Más recientemente, se ha reportado la detección del gen codificante para F5 en aislamientos de *E. coli* no clasificada como ETEC (Nguyen, Vo y Vu-Khac 2011; Maciel et al. 2019).

Se sabe que el gen codificante para F5 se ubica en plasmido y tiene afinidad por un receptor glicolípido (NeuGCGM3), mientras que F41 se codifica en el cromosoma y se une a un receptor glicoproteico (Russo y Johnson 2004).

1.5.1.2 F17

Esta fimbria se compone por dos subunidades principales: la subunidad estructural mayor F17A, que se ensambla para formar la fimbria, y la subunidad menor F17G, responsable de reconocer los receptores de N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) presentes en las células intestinales bovinas (Le Bouguéneq y Bertin 1999). Se conocen cuatro variantes de la subunidad principal de fimbria F17A y dos variantes de la subunidad menor F17G: F17GI y F17GII, las cuales se asocian aleatoriamente. Se ha demostrado que este polimorfismo de las subunidades da lugar a diferente especificidad por el receptor y genera diferentes trastornos clínicos.

Las fimbrias F17 se codifican en plásmidos y cromosomas de aislamientos InPEC y ExPEC (Mainil, Gérardin, y Jacquemin 2000; Nagy y Fekete 2005; Bihannic et al. 2014).

1.5.1.3 Adhesina autoaglutinante de STEC (Saa)

Esta adhesina se identificó inicialmente en un aislamiento de STEC O113:H21. Posteriormente, se determinó que estaba presente en varias otras cepas de STEC recuperadas de pacientes con diarrea o Síndrome urémico hemolítico (SUH) (Croxen et al. 2013). El gen *saa* se ha asociado significativamente con cepas STEC recuperadas de bovinos, lo que sugiere un rol en la unión al intestino de estos animales. Sin embargo, se necesitan más estudios para determinar su papel en la patogenia (Jenkins et al. 2003; Steyert et al. 2012).

1.5.1.4 CS31A

Son adhesinas no fimbriales cuyo mecanismo de acción incluye la unión al receptor de ácido N-acetilneuramínico (Di Martino et al. 1995). Las CS31A se encuentran relacionadas inmunológica y estructuralmente con la familia de fimbrias F5 (Girardeau et al. 1988). Se han identificado en cepas de *E. coli* recuperadas de terneros sanos, con diarrea y septicémicos (Nagy y Fekete 1999; Kolenda, Burdukiewicz y Schierack 2015; Umpiérrez 2016; Umpiérrez et al. 2020). Asimismo, en aislamientos de bovinos, se han vinculado con fimbrias F17 y P y toxinas Cnf1, entre otras (Le Bouguéneq y Bertin 1999).

Las secuencias génicas codificantes de CS31A se encuentran en plásmidos (Girardeau et al. 1988).

1.5.1.5 Fimbrias S

Las adhesinas fimbriales S (Sfa) reconocen y se adhieren a moléculas receptoras en la superficie celular que contienen ácido α -siálico (Korhonen, Vaisanen-Rhen y Rhen 1984). Morfológicamente, son similares a las fimbrias tipo 1 o P, es decir, tienen de 1 a 2 μ m de longitud y alrededor de 5 a 7 nm de diámetro (Korhonen, Vaisanen-Rhen y Rhen 1984). Estas fimbrias se encuentran frecuentemente en aislamientos intestinales de animales sanos y con diarrea, así como también en aislamientos asociados a infecciones extraintestinales (Ott et al. 1986; Kolenda, Burdukiewicz y Schierack 2015).

Están codificadas por el operón *sfa*, que contiene nueve genes (*sfaCBADEFGSH*) y cuya expresión está fuertemente regulada por proteínas y condiciones ambientales (Balsalobre et al. 2003).

1.5.1.6 Fimbrias P

Las fimbrias P, codificadas por los genes *pap* (pili asociados a pielonefritis), se caracterizan por su adherencia a residuos de manosa Gal(α 1-4) β Gal presentes en los glucolípidos de membrana de los eritrocitos y en células uroepiteliales. Estructuralmente, se componen de la subunidad principal, PapA, y de subunidades menores, PapE y PapF, y adhesina de unión al receptor, PapG, en el extremo distal (Lane y Mobley 2007). Las fimbrias Pap son significativamente más prevalentes entre las cepas de UPEC que causan pielonefritis y se han asociado más frecuentemente a animales sanos que con diarrea (Lane y Mobley 2007; Kolenda, Burdukiewicz y Schierack 2015).

Los genes codificantes para la fimbria P, se organizan en el operón *pap*, ubicado en el cromosoma. Estos genes, codifican para cinco subunidades de pilina (PapF, PapE, PapK, PapA, PapH) y una adhesina (PapG). Tras su transferencia al periplasma, con la ayuda de la chaperona periplásmica (PapD) y el acomodador de membrana externa integral (PapC), las unidades estructurales se ensamblan ordenadamente (Volkan et al. 2012; Omattage et al. 2018).

1.5.1.7 Afa8

La adhesina Afa es afimbrial y está compuesta por dos proteínas: AfaE, que media la adhesión a las células epiteliales, y AfaD, que participa en la invasión (Le Bouguéneq y Bertin 1999). El gen *afaE* es muy heterogéneo y produce adhesinas antigénicamente diferentes (Labigne-Roussel y Falkow 1988).

Los aislamientos de *E. coli* expresan diferentes grupos de genes *afa* y todos sus productos están involucrados en la adhesión e internalización en las células epiteliales (Lila Lalioui et al. 1999). En particular, el tipo Afa8E es frecuente y altamente conservado entre las cepas de *E. coli* productoras de Cnf1 o Cnf2, aunque también se han detectado entre cepas no productoras de Cnf aisladas de terneros y lechones. Se ha propuesto, que todas estas bacterias que expresan *afa8* están asociadas con diarrea, septicemia e infecciones de órganos internos en las que el sitio de entrada es el intestino (Lila Lalioui et al. 1999).

El operón *afa8* se encuentra en una isla de patogenicidad (PAI) con características de movilidad (IAL862) (Lalioui y Le Bouguéneq 2001).

1.5.1.8 Intimina (Eae)

La adhesina intimina de *E. coli* es necesaria para originar las lesiones intestinales características de adherencia y borramiento (A/E) (Figura 1.3). La lesión se produce por un reordenamiento del citoesqueleto de actina de la célula huésped, que destruye la arquitectura normal de las microvellosidades (Jerse et al. 1990; Frankel et al. 1998). Los trastornos provocados en el citoesqueleto del enterocito se acompañan de una respuesta inflamatoria y diarrea (Kaper, Nataro y Mobley 2004).

El proceso ocurre en varias etapas:

- 1) Adhesión inicial de las bacterias a la superficie y microvellosidades de las células huésped.
- 2) Translocación de proteínas bacterianas a las células del huésped por T3SS. A través de la fosforilación de proteínas eucariotas, se provoca la polimerización de actina, el reordenamiento del citoesqueleto y el borramiento de las microvellosidades de los enterocitos.

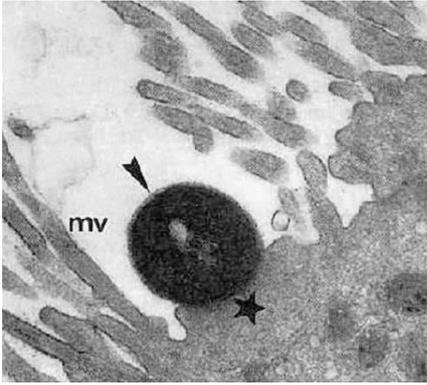


Figura 1.3 Lesión de adherencia y borrado provocada por EPEC

La flecha muestra el borramiento de las microvellosidades (mv) y el pedestal (estrella). Tomado de Pedroso y colaboradores (1993), con permiso del director de Revistas de la Sociedad Americana de Microbiología.

- 3) Adherencia íntima de las bacterias a la membrana citoplasmática del enterocito. Aquí es donde interviene la intimina, codificada por el gen *eae*. El receptor celular Tir también es una proteína bacteriana, secretada por un T3SS y fosforilado dentro del enterocito, antes de integrar la membrana celular eucariótica. En esta última etapa, se produce un reordenamiento del citoesqueleto que forma un pedestal debajo de las células bacterianas adheridas (Figura 1.3) (Kaper, Nataro y Mobley 2004; Mainil y Daube 2005).

Al menos 27 tipos y subtipos distintos de intimina han sido identificados (α , $\alpha 2$, β , $\beta 2$, $\beta 3$, δ , ϵ , $\epsilon 2$, $\epsilon 3$, $\epsilon 4$, η , $\eta 2$, γ , $\gamma 2$, ι , $\iota 2$, κ , λ , μ , ν , \omicron , π , ρ , σ , ξ , θ , ζ) basándose en la región heterogénea 3' del gen *eae* (Zhang et al. 2013). Este gen se ubica en una isla de patogenicidad denominada *Locus of Enterocyte Effacement* (LEE), donde también se encuentran los genes necesarios para la síntesis de Sistemas de secreción de tipo 3 (T3SS) y del Receptor de intimina translocado (Tir) (Nataro y Kaper 1998; Mainil y Daube 2005).

1.5.2 Toxinas

Además de las adhesinas, existen otros importantes factores asociados a virulencia que pueden interactuar directamente con las células. Las toxinas son proteínas que pueden dirigirse al citoesqueleto, al metabolismo o la membrana citoplasmática celular (Mainil 2013).

1.5.2.1 Factor citotóxico necrotizante (Cnf)

El nombre de estas toxinas alude a la capacidad de inducir células multinucleadas en cultivos celulares HeLa y Vero y causar necrosis en piel de conejo (De Rycke et al. 1990; Sigrid Van Bost et al. 2001). Las Cnf se han asociado a infecciones intestinales y extraintestinales en varias especies, incluidos bovinos y humanos (Sigrid Van Bost et al. 2001).

Las toxinas Cnf1 y Cnf2 están genética y antigénicamente relacionadas, aunque el gen que codifica para Cnf1 se localiza en el cromosoma y el que el que codifica para Cnf2 en el plásmido Vir (Sigrid Van Bost et al. 2001).

1.5.2.2 Toxina termolábil y termoestable (Ly St)

Las enterotoxinas termolábil (Lt) y termoestable (St) ocasionan profundos cambios funcionales en las células epiteliales del intestino delgado, provocando un aumento de la secreción de H₂O, Na⁺ y Cl⁻ y una disminución de la absorción de líquidos, lo que resulta en la deshidratación y acidosis del huésped (Nagy y Fekete 2005). Las Lt se relacionan con la toxina de *Vibrio cholerae* (toxina del cólera, Ct), una molécula altamente inmunogénica con la que presentan reacción cruzada de anticuerpos. Por su parte, las St son poco inmunogénicas y no se ha observado reactividad cruzada inmunológica entre ellas (Dubreuil, Isaacson y Schifferli 2016).

Se diferencian dos tipos para cada una de las enterotoxinas LTI y II y StI y II. Los genes codificantes para las toxinas LtI se encuentran ubicados en plásmidos y están flanqueadas por secuencias de inserción (IS), mientras que el tipo II se ubica dentro de un profago lambdaoide (Jobling 2016). El gen codificante para StI (*sta*) es parte del transposón Tn1681, y el gen que codifica para StII (*stb*) forma parte del transposón Tn4521 (Fekete et al. 2003).

1.5.2.3 Toxinas Shiga (Stx)

Las Stx de *E. coli* se clasifican primariamente en dos grupos: las Stx1 son antigénicamente muy cercanas a la toxina de *Shigella dysenteriae* tipo 1, mientras que Stx2 se relacionan de manera más lejana. Estructuralmente, se componen de una subunidad biológicamente activa, y otra que participa en la unión al receptor celular y en la endocitosis (Mainil y Daube 2005). *In vivo*, las Stx se producen en los intestinos después de la colonización bacteriana y, luego de atravesar la pared intestinal, entran en el torrente sanguíneo

(toxemia) desde donde pueden alcanzar diferentes tejidos susceptibles, inhibir la síntesis de proteínas y provocar muerte celular (Mainil y Daube 2005). La especificidad de la diana celular de las Stx depende de la cantidad de receptores específicos presentes en la membrana celular: Gb3 (Gal(α 1-4)Gal) para Stx1 y Stx2, y Gb4 (GalNAc(β 1-3)Gal(α 1-4)Gal) para Stx2e y Stx2f. En lechones y humanos, las principales células diana son las células endoteliales de arterias pequeñas, de la mucosa gastrointestinal, los riñones, el cerebro y otros tejidos, lo que conduce a hemorragias con consecuentes lesiones tisulares y síndromes clínicos (Mainil y Daube 2005). Por otro lado, los bovinos carecen de receptores Gb3 para las toxinas Stx en las células endoteliales de sus vasos sanguíneos, lo que ha llevado a pensar que estos son intrínsecamente resistentes y portadores asintomáticos de STEC (Pruimboom-Brees et al. 2000). Sin embargo, estudios más recientes han proporcionado evidencia de que existen diferentes tipos de células diana para Stx en el ganado, como por ejemplo los linfocitos intestinales y periféricos, células epiteliales colónicas y células similares a macrófagos, que residen en la mucosa bovina (Menge 2020). Las Stx pueden afectar la función de los linfocitos T y B, lo que sugiere que podrían modular la respuesta inmunitaria con posibles consecuencias sobre la supervivencia de STEC, la colonización del tracto gastrointestinal bovino y el establecimiento de una relación simbiótica con el hospedador adulto (Sapountzis et al. 2020).

Existen numerosas variantes de Stx1 y 2, que difieren en sus secuencias génicas, en su antigenicidad y en la toxicidad celular e impactan diferente en la severidad de la infección. En la actualidad se han identificado 107 variantes: el subtipo Stx1 incluye 9 variantes de Stx1a (incluida la toxina Shiga de *S. dysenteriae*), 4 de Stx1c y 1 de Stx1d, y los subtipos de Stx2 incluyen 21 variantes de Stx2a, 16 de Stx2b, 18 de Stx2c, 18 de Stx2d, 14 de Stx2e, 2 de Stx2f y 4 de Stx2g (Scheutz 2014). Todos los subtipos de Stx1 y los subtipos Stx2b, Stx2e, Stx2f y Stx2g de Stx2 se vinculan mayoritariamente a baja toxicidad en seres humanos, mientras que los subtipos Stx2a, Stx2c y Stx2d poseen elevados niveles de toxicidad (Akiyama et al. 2017). Los genes codificantes de Stx se ubican dentro de la secuencia de un bacteriófago similar a lambda, lo que le confiere sus características de transmisibilidad (Melton-Celsa 2014).

1.5.2.4 Toxina de distensión citoletal (Cdt)

Las Cdt son holotoxinas heterotriméricas que constan de las subunidades CdtA, CdtB y CdtC. CdtB corresponde a la subunidad activa, mientras que CdtA y CdtC participan en la unión y el transporte de CdtB a la célula diana. Las Cdt inducen roturas de doble cadena en el ADN que conducen a la muerte celular (Meza-Segura et al. 2017). Se han identificado en aislamientos de DEC y no DEC, y se han asociado a síntomas de diarrea, vómitos y fiebre en niños (Patzí-Vargas et al. 2015; Meza-Segura et al. 2017).

En *E. coli*, se conocen al menos cinco tipos de Cdt (I a V) aunque, en todos los casos, los operones *cdtABC* son parte del genoma de un profago, un plásmido, forman parte de una PAI o se enmarcan con genes de fagos lambdoides (Tóth y Schneider 2015).

1.5.2.5 Hemolisinas

E. coli produce varios tipos de hemolisinas (α , β , etc.). El principal rol de las hemolisinas en la patogénesis probablemente es facilitar la liberación de hemoglobina presente en los glóbulos rojos y aportar el hierro necesario para el crecimiento bacteriano (Nataro y Kaper 1998; Paton y Paton 1998; Otto et al. 1996).

En particular, la enterohemolisina Ehx, es codificada por cuatro genes (*ehxC*, *ehxA*, *ehxB* y *ehxD*) ubicados en un plásmido pEHEC, el cual está presente en todas las cepas EHEC O157: H7 (Mainil y Daube, 2005). No obstante, también se ha asociado positivamente en los aislamientos STEC, aunque en diferente proporción dependiendo de la región (Beutin et al. 1989; Beutin, Zimmermann y Gleier 1996; Mainil y Daube 2005).

1.5.3 Mecanismos de captación de hierro

El hierro se encuentra fuertemente unido a proteínas del huésped, como la transferrina (Tf) y la lactoferrina (Lf), lo que dificulta que las bacterias lo adquieran. Las bacterias patógenas han desarrollado varios mecanismos para adquirir hierro del huésped. Por ejemplo, algunas bacterias poseen receptores de proteínas de membrana externa que reconocen específicamente el complejo de Tf-hierro o Lf-hierro, lo que da como resultado la internalización de este metal. Además, como ya se mencionó en el apartado anterior, las bacterias pueden utilizar el hierro liberado de los compuestos hemo, tras la lisis de los eritrocitos (Otto, Verweij-Van Vught y Maclaren 1992).

Alternativamente, las bacterias adquieren el hierro del huésped, secretando moléculas de bajo peso molecular quelantes de hierro (sideróforos), que pueden unirse a este metal con una alta afinidad y compitiendo con las proteínas de unión al hierro del huésped (Otto, Verweij-Van Vught y Maclaren 1992; Finlay y Falkow 1997). Los sideróforos unidos al hierro pueden ser reabsorbidos para la utilización del hierro quelado. Estas moléculas se encuentran como un mecanismo de captación de hierro en todo el reino procariota y su contribución a la virulencia varía entre patógenos (Finlay y Falkow 1997).

1.5.3.1 Aerobactina

En *E. coli*, el sideróforo aerobactina es el más eficaz de los sistemas de quelación del hierro y juega un rol importante en la colonización tanto para las cepas intestinales como para las extraintestinales (Johnson 1991; Torres et al. 2001). El sistema de aerobactina se organiza en un operón de cinco genes, cuatro de ellos que codifican para las enzimas necesarias para la síntesis de aerobactina (*iucA*, *iucB*, *iucC* e *iucD*, por *iron uptake chelateiuc*) y un quinto gen que codifica para la proteína receptora de la membrana externa (*iutA*, por *iron uptake transport*;) e interviene en la unión de los complejos ferri-aerobactina y en la internalización (Martínez, Herrero y de Lorenzo 1994). Los cinco genes que conforman el operón, se encuentran tanto en plásmidos como en el cromosoma bacteriano (Johnson 1991).

1.6 Clasificación en virotipos

Como se mencionó anteriormente, las cepas de *E. coli* patogénica han sido clasificadas en diferentes virotipos, los cuales se caracterizan por la presencia o ausencia de genes (Mainil 2013).

1.6.1.1 ETEC

Se caracteriza por la presencia de al menos uno de los genes que codifican para la Lt y/o St (Sahl, Morris y Rasko 2013). ETEC es uno de los virotipos más importante responsable de causar diarrea acuosa severa en terneros recién nacidos (Nagy y Fekete 2005; Robins-Browne et al. 2016).

Las adhesinas de ETEC no solo median su adherencia al íleon, sino que permiten transferir más efectivamente las enterotoxinas a las células intestinales, por lo que se les considera importantes FV (Nagy y Fekete 2005). Algunas de las fimbrias más

comúnmente expresadas en cepas de ETEC causantes de DNT son F5, F41 y F17, entre otras (Nagy y Fekete 2005).

Este virotipo ha sido reconocido como la principal causa de DNT, especialmente en los cuatro primeros días de vida; los terneros de mayor edad y los adultos son más resistentes a las infecciones por ETEC (Foster y Smith 2009).

1.6.1.2 STEC

Entre los numerosos virotipos de *E. coli*, las cepas STEC, caracterizadas por la presencia del gen *stx*, poseen la más amplia notoriedad (Mainil y Daube 2005). Este hecho ha dado lugar a varios sistemas de nomenclatura: STEC y VTEC. Si bien ambos nombres se siguen utilizando ampliamente, en este trabajo se utilizará la nomenclatura STEC.

En el humano, las STEC se asocian con síntomas que van desde diarrea moderada a colitis hemorrágica (CH) (Sahl, Morris y Rasko 2013). Los aislamientos que producen Stx2 se asocian más a menudo con el SUH que los que sólo producen Stx1 (Mainil y Daube 2005). En efecto, en Uruguay, se han identificado casos de SUH provocados por cepas positivas a los genes *stx2* y *eae* (Pérez et al. 2014). La nefrotoxicidad provocada por la infección intestinal puede conducir al daño renal crónico, diálisis, e incluso a la necesidad de un trasplante (Pruimboom-Brees et al. 2000). También se pueden observar trastornos neurológicos como secuela del Púrpura trombótica trombocitopénica (PTT), un trastorno caracterizado por hemólisis, trombocitopenia, insuficiencia renal y fiebre fluctuante (Mainil y Daube 2005). Aunque en lechones se observan claros signos clínicos como la neurotoxicidad, pérdida de coordinación, cojera, parálisis y muerte súbita, los terneros infectados por STEC no desarrollan el SUH ya que carecen de los receptores para Stx en las células endoteliales de sus vasos sanguíneos (Pruimboom-Brees et al. 2000). Si bien diversas especies como cabras, ovejas, bisontes, caballos, cerdos y búfalos de agua, son capaces de albergar STEC, el ganado vacuno se reconoce como el principal reservorio (Persad y LeJeune 2014).

STEC es responsable de una variedad de brotes en humanos por lo que se considera un virotipo muy relevante para la salud pública. En 1982, surgieron 2 brotes en Estados Unidos asociados al consumo de hamburguesas contaminadas con *E. coli* O157:H7 (Scheutz 2014). Este serotipo se ha detectado frecuentemente en muestras fecales de ganado en el momento del sacrificio (Tutenel et al. 2002). Los síntomas de los pacientes

infectados incluyeron diarrea sanguinolenta sin leucocitos fecales y sin fiebre, y se desarrollaron durante 2 a 9 días. En aquella oportunidad, no hubo muertes ni secuelas en ningún caso (Scheutz 2014). Otro importante brote, ocurrió en 1999 y se vinculó al consumo de agua contaminada (Rangel et al. 2005). En 2006, se originó otro brote provocado por el consumo de espinaca contaminada, donde el 29 % de los pacientes desarrollaron SUH (Pacheco y Sperandio 2012). En 2011 ocurrió en Alemania uno de los mayores brotes de gastroenteritis y SUH, el cual dejó además 36 personas fallecidas. El mismo se asoció al consumo de coles, cuyas semillas provenientes de Egipto estaban contaminadas con una nueva variante de STEC, cepa híbrida EAEC-STECS, del serogrupo O104:H4 (Scheutz 2014). En el mismo año, ocurrió en Japón otro gran brote esta vez ocasionado por O111:H8, dejando 5 pacientes fallecidos (Terajima et al. 2014).

Los aislamientos STEC se dividen en un grupo que contiene la isla de patogenicidad LEE y otro que no la tiene (Sahl, Morris y Rasko 2013). Las cepas STEC LEE+, frecuentemente son llamadas EHEC debido a la manifestación de CH en hospederos infectados (Sahl, Morris y Rasko 2013). Si bien la enterotoxigenicidad de las Stx es conocida, se acepta que la diarrea que ocurre durante la infección por STEC LEE+ en humanos y terneros es consecuencia de la formación de lesiones de A/E y no de la producción de Stx. Por otro lado, el aspecto hemorrágico de la diarrea observada en humanos, sería la consecuencia de la acción del Stx sobre las células endoteliales de los vasos presentes en la mucosa intestinal (Pruimboom-Brees et al. 2000). Por último, se ha demostrado que para que ocurra la colonización de STEC LEE+ en terneros recién nacidos y la formación de lesiones A/E que causan enfermedad, es necesaria la presencia de la intimina (Dean-Nystrom et al. 1998).

Se reconoce que las principales vías de transmisión de STEC LEE+ a los humanos son la leche y la carne cruda contaminada, aunque también existe transmisión de persona a persona y por consumo de agua contaminada (Gonzalez y Cerqueira 2020; Mainil y Daube 2005).

STEC LEE-

Corresponden a las STEC que carecen de la isla de patogenicidad LEE. Estas *E. coli* son incapaces de provocar la lesión A/E y, por lo tanto, los mecanismos moleculares de patogenicidad difieren de las STEC LEE+ (Croxen et al. 2013). En humanos, STEC LEE-

es responsable de la CH y el SUH (Bettelheim 2007; Tozzoli y Scheutz 2014). En efecto, el mayor brote de SUH reportado hasta el momento, ocurrido en Alemania en 2011, se asocia con el este virotipo (Croxen et al. 2013).

1.6.1.3 EPEC

Los aislamientos EPEC se clasifican por la presencia de LEE y la ausencia de los genes *stx*. En el pasado, este virotipo ha sido la principal causa de diarrea infantil en países en vías de desarrollo (Nataro y Kaper 1998). Gracias a la mejora de las condiciones de higiene, la frecuencia de infecciones causadas por EPEC decreció en los países industrializados, aunque continúa siendo una importante causa de diarrea (Nataro y Kaper 1998).

Los aislamientos que contienen la región LEE y el plásmido conocido como Factor de adherencia (Eaf) que codifica para la formación del haz de pili (Bfp+), son frecuentemente llamadas EPEC típicas (tEPEC), mientras que los aislamientos Bfp- se agrupan dentro de las EPEC atípicas. Tanto tEPEC como aEPEC se asocian con diarrea, lo que sugiere que Bfp no es absolutamente necesario para la virulencia de EPEC (Sahl, Morris y Rasko 2013).

Las EPEC atípicas están íntimamente relacionadas con las STEC, ya que comparten atributos de virulencia específicos, como islas de patogenicidad, por ejemplo, LEE (incluido el gen *eae*), la isla O122 (OI) y plásmidos. Más aún, la relación filogénica es independiente de la presencia o ausencia de fagos que codifican *Stx*, lo que destaca la estrecha relación entre los linajes LEE+, EPEC y STEC (Hazen et al. 2013).

1.6.1.4 NTEC

Las cepas NTEC se caracterizan por producir Cnf1 y/o Cnf2. NTEC1 ha sido aislada de casos de enteritis en rumiantes, chanchos, conejos, perros y caballos y de infecciones extraintestinales en perros, gatos, humanos y chanchos. En tanto, NTEC2 se asocia principalmente a infecciones intestinales y septicemia en rumiantes (Van Bost et al. 2001).

1.7 Grupos filogenéticos de *E. coli*

Tradicionalmente, las cepas de *E. coli* se clasificaron en cuatro grupos filogenéticos: A, B1, B2 y D (Clermont, Bonacorsi y Bingen 2000). Más recientemente, en base a la

tipificación de secuencia multilocus (MLST) y la secuenciación del genoma, se incluyeron los grupos C, E, F y *Escherichia* Clado I (Clermont et al. 2013). Se ha sugerido que las cepas pertenecientes a diferentes grupos filogenéticos muestran diferentes rasgos fenotípicos y genotípicos; por lo tanto, la identificación en estos grupos podría proporcionar información importante sobre sus propiedades fisiológicas y ecológicas (Jang et al. 2017). De esta manera, se ha propuesto que las ExPEC emergen principalmente de los grupos filogenéticos B2, D y, en menor medida, de los grupos C y F. Por otro lado, las cepas EPEC, poseen al menos 10 linajes diseminados en los filogrupos A, B1, E y B2, mientras las STEC se agrupan en los filogrupos E y B1. Aunque se ha visto que algunas cepas STEC híbridas (con genes del grupo ExPEC) agrupan en el grupo A. Por su parte, ETEC también exhibe una gran diversidad agrupándose en los filogrupos A, B1, C y E (Denamur et al. 2020).

Los cuatro grupos filogenéticos principales existen en diversas poblaciones humanas y animales. Se ha sugerido que en los humanos predominan las cepas pertenecientes al grupo A, seguidas de las cepas del grupo B2, mientras que las cepas B1 y D son menos comunes. Paralelamente, en los animales se sugiere el predominio de las cepas pertenecientes al grupo B1, seguidas de las cepas A, B2 y, en menor medida, al grupo D (Tenaillon et al. 2010).

1.8 Serotipificación

Típicamente, los métodos para identificar cepas de *E. coli* han utilizado anticuerpos que testean la presencia de antígenos superficiales (Nataro y Kaper 1998; Fratamico et al. 2016). Los antígenos O polisacáridicos y los H flagelares fueron por largo tiempo la única forma de discriminar cepas patógenas de las comensales, aunque también se han utilizado los antígenos capsulares K y piliars o fimbriales F (Tozzoli y Scheutz 2014; Robins-Browne et al. 2016; Peek et al. 2018). Existen actualmente 186 grupos O de *E. coli* y 53 tipos H, por lo tanto, el serotipado es altamente complejo (Fratamico et al. 2016).

La identificación preliminar mediante caracterización serológica ha sido reemplazada por pruebas directas de presencia de genes de virulencia (Robins-Browne et al. 2016). No obstante, muchos laboratorios aún la utilizan para la identificación preliminar de STEC LEE+, en particular *E. coli* O157:H7 y los serogrupos conocidos como “*big six*” (O26, O45, O103, O111, O121 y O145) (Brooks et al. 2005). La incidencia de infecciones transmitidas por alimentos causadas por estos serogrupos no-O157:H7 ha aumentado

significativamente en los últimos años, y como consecuencia son consideradas un riesgo para la salud pública (Take et al. 2020). Sin embargo, las fuentes de infección para los seres humanos, la tasa de portadores en rumiantes y la incidencia real en seres humanos de casos distintos de O157:H7 pueden ser difíciles de estimar, ya que muchos programas de vigilancia epidemiológica no incluyen estos serogrupos. Se han informado infecciones humanas por STEC pertenecientes a los serogrupos O48, O91, O104 y O113 y si bien estas cepas no parecen tener su origen en el consumo de alimentos, se pueden aislar cepas similares de las heces y el contenido intestinal de rumiantes y de alimentos (Mainil y Daube 2005).

1.9 Genotipado

La identificación de bacterias a nivel de cepa brinda información relevante para establecer un correcto diagnóstico y tratamiento de las infecciones y es útil para realizar estudios epidemiológicos. La elevada variabilidad genética de *E. coli*, hace que su identificación a tal nivel, sea particularmente difícil (Kotłowski et al. 2020). Existen varias técnicas utilizadas para identificar diferentes cepas de *E. coli*, en los siguientes párrafos se describen las utilizadas en este trabajo.

1.9.1 Rep-PCR

Esta técnica, desarrollada por Versalovic y colaboradores (1994), permite la identificación de huellas genómicas generadas mediante la técnica de PCR (*rep*-PCR) (Versalovic et al. 1994). Es un método de tipificación del genoma completo que puede revelar la alteración de las estructuras del genoma microbiano, lo que permite utilizarla en estudios de plasticidad, filogenia molecular y la evolución de los genomas (Ishii y Sadowsky 2009).

La técnica se basa en utilizar secuencias cortas, altamente repetitivas y no codificantes, que se encuentran en los genomas procariotas. Dado que estas secuencias repetidas permanecen conservadas y se encuentran distribuidas de forma variable en las bacterias, es posible utilizar cebadores para la amplificación de fragmentos de diferentes tamaños, identificando así las huellas dactilares de ADN de muchos microorganismos diferentes (Versalovic et al. 1994). En particular, la PCR de consenso intergénico repetitivo enterobacteriano (ERIC) se utiliza para amplificar diversas regiones de ADN que están flanqueadas por secuencias conservadas para generar huellas genéticas que son

específicas de *E. coli* (Ateba y Mbewe 2014). Los patrones de huellas dactilares de ADN se pueden comparar para estimar diferentes grados de similitud entre los aislamientos y ayudar a determinar si éstos están relacionados clonalmente (Versalovic et al. 1994). ERIC-PCR se considera un método muy sensible para detectar diferencias entre aislamientos de *E. coli* (Ateba y Mbewe 2014).

1.9.2 Electroforesis en gel de campo pulsado (*Pulsed-field gel electrophoresis*, PFGE)

Debido a su alto poder discriminatorio, PFGE se considera la técnica *Gold standard* para la tipificación epidemiológica de *Enterobacteriaceae* (Brolund et al. 2010). Mediante esta técnica, el genoma bacteriano se digiere con una enzima de restricción. Los escasos sitios de unión permiten generar un número limitado de fragmentos de ADN con diferentes tamaños moleculares. Estos fragmentos pueden separarse mediante técnicas especializadas de electroforesis generando diferentes patrones de restricción. Las diferencias en los perfiles de restricción se utilizan para realizar comparaciones genéticas entre aislamientos (Foley, Lynne y Nayak 2009).

El PFGE ha sido ampliamente utilizado para generar bases de datos de patrones de restricción y su análisis ha permitido comparar y reconocer por ejemplo nuevos brotes de enfermedades transmitidas por alimentos, facilitando así las investigaciones epidemiológicas (Ribot et al. 2006). Esta técnica, ha mostrado mayor poder discriminativo que *rep-PCR* en la agrupación de aislamientos de *E. coli* pertenecientes a diferentes secuenciotipos y se ha propuesto que su utilización sería más adecuada para investigar brotes en un espacio limitado, por ejemplo, un sector de un hospital (Bae et al. 2014).

1.10 Resistencia a los antimicrobianos

E. coli representa un importante reservorio de genes de resistencia que pueden ser responsables de los fracasos del tratamiento tanto en la medicina veterinaria como humana. Durante las últimas décadas, se ha identificado un número creciente de genes de resistencia en aislamientos de *E. coli*, muchos de los cuales se adquieren por transferencia horizontal. En el acervo de genes de las enterobacterias, *E. coli* actúa como donante y como receptor de genes de resistencia y, por lo tanto, puede adquirir genes de resistencia de otras bacterias, pero también puede transmitirlos. La resistencia a los antimicrobianos en *E. coli* zoonótica se considera uno de los principales desafíos a escala mundial y debe

considerarse como un problema real de la salud pública (Poirel et al. 2018; Peek et al. 2018).

1.10.1 Principales grupos de antimicrobianos y mecanismos de resistencia de *E. coli*

A continuación, se describen los principales grupos de antimicrobianos de relevancia en la clínica veterinaria y los mecanismos de resistencia de *E. coli*.

1.10.1.1 Betalactámicos

De origen natural o semisintético, se caracterizan por poseer un anillo betalactámico en su estructura. Su mecanismo de acción consiste en inhibir la última etapa de síntesis de la pared celular bacteriana. Gracias a su escasa toxicidad y su amplio margen terapéutico, son la familia de antibióticos más numerosa y utilizada en la clínica. Incluyen cuatro grupos diferentes: penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos y carbapenemes (Seija y Vignoli 2008; Vignoli y Seija 2008).

Existen numerosos genes en *E. coli* que confieren resistencia a los betalactámicos. Algunos de ellos, como *bla*_{TEM-1}, están muy extendidos en *E. coli* recuperadas de animales, sin embargo, su espectro de acción es estrecho, pudiendo inactivar penicilinas y aminopenicilinas. En los últimos años, se han detectado genes que codifican para betalactamasas de espectro extendido (BLEE/AmpC) en aislamientos de humanos y animales. Las cepas de *E. coli* productoras de BLEE son clínicamente relevantes en medicina veterinaria, ya que confieren resistencia a las penicilinas, aminopenicilinas y cefalosporinas (Poirel et al. 2018). En adición, la mayoría de estos genes se localizan en plásmidos, lo que facilita su diseminación (Carattoli 2013). Más recientemente, también se han identificado genes que codifican para carbapenemasas en *E. coli* recuperadas de animales (Manges et al. 2019). Afortunadamente, existen antibióticos inhibidores de betalactamasas capaces de inhibir la acción de estas enzimas mediante la unión relativamente irreversible. Existen tres de uso clínico: ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam (Seija y Vignoli 2008).

1.10.1.2 Aminoglucósidos

Una vez dentro de la célula bacteriana, los aminoglucósidos se unen a la subunidad ribosomal 30S, interrumpiendo la síntesis de proteínas bacterianas normales (Dowling 2013). En Uruguay están disponibles la gentamicina (GEN), amikacina (AK) y estreptomina (STR) y tobramicina (TOB). También está la espectinomicina, pero no

tiene aminoazúcares y, por lo tanto, no es un verdadero aminoglucósido (Seija y Vignoli 2008).

La resistencia a los aminoglucósidos puede desarrollarse por mutaciones en el ARN ribosomal. Sin embargo, *E. coli* posee un bajo número de copias de ARN 16S, por lo que esta estrategia parece improbable. Por otro lado, la inactivación de los aminoglucósidos se lleva a cabo mediante enzimas que modifican la droga, de manera que no puedan alcanzar o unirse al sitio blanco. Actualmente, se conocen tres tipos de enzimas capaces de modificar los aminoglucósidos: las acetiltransferasas, las nucleotidiltransferasas y las fosfotransferasas (Poirel et al., 2018).

1.10.1.3 Quinolonas

Las quinolonas y fluoroquinolonas son importantes agentes antimicrobianos utilizados para el tratamiento de varios tipos de infecciones, tanto en animales como en humanos. Las quinolonas interactúan con dos sitios diferentes: la ADN girasa y la topoisomerasa IV. Su mecanismo de acción consiste en la inhibición de la síntesis del ADN (Hopkins, Davies y Threlfall 2005). Las quinolonas se clasifican en generaciones, según aumentan su espectro de acción. La primera generación incluye el ácido nalidíxico (NAL) y ácido pipemídico, la segunda la norfloxacin y ciprofloxacina (CIP), que incorporan un átomo de flúor (fluoroquinolonas), las de tercera generación son la levofloxacina, gatifloxacina y enrofloxacina (ENR), y las de cuarta generación son la moxifloxacina, trovafloxacina (Vignoli y Seija 2008; Seija y Vignoli 2008).

La resistencia de las bacterias a las quinolonas generalmente se debe a mutaciones en el blanco del fármaco, los genes cromosomales de la ADN girasa y de la topoisomerasa IV (Hopkins, Davies y Threlfall 2005).

Adicionalmente, se han identificado varios mecanismos de resistencia codificados en plásmidos (*plasmid-mediated quinolone resistance*, PMQR) que incluyen (i) proteínas similares a Qnr (QnrA, QnrB, QnrC, QnrD y QnrS) que protegen el ADN de la unión de quinolonas, (ii) la *Aac (6') - Ib-cr* acetiltransferasa que modifica ciertas fluoroquinolonas como la CIP y ENR, y (iii) bombas de eflujo activo (QepA y OqxAB). En general, estos determinantes de resistencia no confieren un alto nivel de resistencia a las quinolonas (o fluoroquinolonas), sino que confieren una susceptibilidad reducida a esos agentes antimicrobianos. A menudo, los genes PMQR se asocian con otros genes de resistencia y

pueden encontrarse en transposones y/o asociados a integrones ubicados en plásmidos multirresistentes (Rodríguez-Martínez et al. 2016).

1.10.1.4 Sulfonamidas y trimetoprima

Las sulfonamidas y la trimetoprima son agentes antimicrobianos sintéticos que inhiben diferentes pasos en la vía de síntesis del ácido fólico. El ácido fólico actúa como coenzima en la transferencia de grupos metilo a las bases purínicas y pirimidínicas para la síntesis del ADN y el ARN. Por lo tanto, su inhibición repercute sobre la síntesis nucleotídica, con la consiguiente inhibición del crecimiento bacteriano (Seija y Vignoli 2008; Vignoli y Seija 2008).

Cada uno de estos agentes actúa de manera bacteriostática, mientras que la combinación de una sulfonamida con trimetoprima produce efectos sinérgicos. Las sulfonamidas y la trimetoprima se han utilizado durante décadas en animales y seres humanos. Los mecanismos de resistencia adquiridos se han identificado con frecuencia debido principalmente a (i) modificaciones mutacionales en los genes que codifican para las enzimas diana, la dihidropteroato sintasa o dihidrofolato reductasa, respectivamente, o (ii) la adquisición de genes *sul* que codifican las dihidropteroato sintetasas insensibles a sulfonamidas o genes *dfr* que codifican dihidrofolato reductasas que son insensibles a trimetoprim (van Duijkeren et al. 2018).

1.10.1.5 Tetraciclinas

Las tetraciclinas son activas sobre microorganismos Gram positivos y Gram negativos, y patógenos intracelulares como clamidias, micoplasmas y rickettsias. Su mecanismo de acción se debe a la inhibición de la síntesis proteica por unión a la subunidad ribosomal 30S (Seija y Vignoli 2008; Vignoli y Seija 2008).

En *E. coli* se han identificado genes que codifican para las proteínas que median el eflujo de tetraciclina, genes que codifican para proteínas protectoras de ribosoma y un gen que codifica para una oxidorreductasa que inactiva las tetraciclinas. No obstante, los principales mecanismos de resistencia son el eflujo activo mediado por proteínas y la protección de los ribosomas (Poirel et al. 2018).

1.11 Hipótesis

La presencia de ciertos factores de virulencia de *E. coli* aisladas de bovinos podría estar asociada a las altas tasas de mortalidad de terneros observadas en Uruguay. Los aislamientos recuperados del ambiente extraintestinal de animales muertos podrían presentar atributos de virulencia y características moleculares que difieran de los recuperados del ambiente intestinal. La presión que ejerce el uso de antimicrobianos en la clínica veterinaria podría derivar en un aumento en la resistencia de *E. coli* recuperados de animales muertos y los mecanismos moleculares que subyacen podrían estar asociados a elementos genéticos móviles capaces de diseminar la resistencia entre bacterias.

1.12 Objetivo general

El objetivo principal fue caracterizar los perfiles genéticos de virulencia de aislamientos de *E. coli* recuperados del ambiente intestinal y extraintestinal de terneros muertos en establecimientos del país.

1.13 Objetivos específicos

- Generar en nuestro laboratorio, la colección de aislamientos de *E. coli* provenientes de animales muertos
- Determinar la presencia e identificar los genes de virulencia presentes en los aislamientos de animales muertos
- Caracterizar los perfiles genéticos de virulencia y asignar los aislamientos a virotipos
- Comparar los perfiles genéticos de virulencia de aislamientos intestinales y extraintestinales
- Determinar la presencia e identificar genes de virulencia circulantes en 3 establecimientos con casos de mortalidad
- Comparar los perfiles genéticos de virulencia identificados en animales vivos y muertos
- Estudiar la variabilidad intraespecífica de la colección
- Investigar los perfiles de sensibilidad a los antimicrobianos y la presencia de genes de resistencia transferibles de los aislamientos caracterizados como EPEC, STEC y NTEC, y asignarlos a los grupos filogenéticos y serogrupos comunes de *E. coli*.

2 Metodología

2.1 Procedencia de los aislamientos de *E. coli*

Este trabajo se enmarcó en el proyecto “Estimación de la morbilidad y mortalidad de las enfermedades que afectan la cría de los terneros lecheros del Uruguay e identificación de los principales factores asociados a sus frecuencias” (PL-15), coordinado por INIA-La Estanzuela. Entre los años 2015 y 2017, personal de la plataforma de investigación en Salud Animal de INIA-La Estanzuela recuperó e identificó aislamientos de *E. coli* a partir de diferentes muestras biológicas de terneros.

Según el criterio establecido por los profesionales de INIA, dependiendo del estado clínico del animal, se tomó una o varias muestras biológicas para aislamiento e identificación de *E. coli*. Los 32 animales que integraron el estudio pertenecieron a los departamentos de Colonia, San José, Canelones y Río Negro (Tabla 2.1). Para la identificación del microorganismo, se seleccionaron colonias lactosa positivas en medio selectivo Mac Conkey (Oxoid) y se realizaron pruebas bioquímicas de rutina (Octavia y Lan 2014). De cada muestra positiva, se envió al Departamento de Microbiología del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE) al menos una colonia y hasta un máximo de 10. En total, se remitieron 328 aislamientos de *E. coli* recuperados de 32 animales; 221 aislamientos se recuperaron de 17 animales muertos y 107 aislamientos pertenecieron a 15 terneros que convivían con los terneros muertos. La Tabla 2.1 y Tabla 2.2 muestran la procedencia de los aislamientos.

2.1.1 Aislamientos provenientes de terneros muertos

Un total de 221 aislamientos de *E. coli* se recuperaron durante las necropsias de 17 animales muertos. De éstos, se sabe que 12 tenían menos de 30 días de edad al momento de su muerte y 1 animal tenía 2 años (Tabla 2.1). Si bien este último provenía de un establecimiento de producción intensiva de carne (corral), el resto de los animales pertenecían a establecimientos de producción lechera. Asimismo, todos los animales presentaban signos de decaimiento, debilidad, neumonía, septicemia o diarrea previo a su muerte. Las características del muestreo y el origen de las *E. coli* se detallan en la Tabla 2.1 y Tabla 2.2.

Tabla 2.1 Características del muestreo de terneros muertos

Animal	Establecimiento	Departamento	Fecha	Edad
1	A	Colonia	jul-2015	s/d
2	B	Colonia	jul-2015	s/d
3	C	Colonia	dic-2015	s/d
4	D	Río Negro	may-2016	5 días
5	E	San José	oct-2016	15 días
6	F	Río Negro	abr-2017	s/d
7	G	Colonia	jul-2017	17 días
8	H	Colonia	jul-2017	2 años
9				
10	I	San José	ago-2017	5-12 días
11				
12	J	Colonia	ago-2017	30 días
13			set-2017	2 días
14	K	Colonia	set-2017	9 días
15	L	Colonia	oct-2017	15 días
16	M	Colonia	oct-2017	10 días
17	N	Canelones	nov-2017	s/d

s/d: sin dato.

2.1.2 Aislamientos provenientes de terneros vivos

Un segundo grupo de 107 aislamientos de *E. coli* provinieron de 15 terneros vivos que convivían con alguno de los animales muertos. En este caso, todos los aislamientos se recuperaron de materia fecal (MF) durante el año 2017. La procedencia de los microorganismos se detalla en la Tabla 2.3.

2.1.3 Nomenclatura de los aislamientos

Tal como se observa en la Tabla 2.2 y Tabla 2.3, los terneros 1 al 17 pertenecieron al grupo de animales muertos y los animales 18 al 32 estaban vivos al momento del muestreo, aunque se desconoce su estado clínico. El número de aislamientos para cada animal muerto varió entre 3 y 59 (Tabla 2.2) y para los vivos entre 6 y 10 (Tabla 2.3)

Todos los aislamientos se nombraron haciendo referencia al número de animal del que se recuperaron, seguido por un punto (.) y el número de identificación del aislamiento en el animal.

Tabla 2.2 Procedencia de aislamientos de *E. coli* recuperados de terneros muertos

Animal	Procedencia	Nº de aislamientos
1	bazo	8
	hígado	8
2	pulmón	10
3	MF	9
	LNM	2
	pulmón	4
	íleon	7
4	riñón	2
	bazo	2
	líq. cefalorraquideo	1
	orina	1
5	riñón	1
	hígado	1
	corazón	1
6	MF	6
7	pulmón	1
	intestino	2
8	vejiga	8
	riñón	8
	hígado	7
9	intestino	6
10	intestino	3
	pulmón	2
	LNM	1
11	contenido intestinal	4
12	MF	5
	intestino	5
13	sistema nervioso central	7
14	íleon	9
	LNM	10
15	MF	10
	cerebro	9
	intestino	10
	hígado	10
	pulmón	10
16	LNM	10
	intestino	5
	LNM	3
	contenido intestinal	10
17	hígado	3
<i>Total</i>		<i>221</i>

MF: materia fecal; LNM: linfonodo mesentérico.

Tabla 2.3 Procedencia de los aislamientos provenientes de animales vivos

Establecimiento	Animal	N° de aislamientos
F	18	6
	19	6
	20	6
	21	6
K	22	10
	23	9
	24	10
	25	10
	26	10
	27	9
	28	9
M	29	5
	30	3
	31	4
	32	4
<i>Total</i>		<i>107</i>

Todos los aislamientos se recuperaron de muestras de materia fecal (MF).

2.2 Extracción de ADN genómico

La extracción de ADN se realizó por el método de lisis térmica, previamente utilizado en nuestro laboratorio. Brevemente, se tomaron dos o tres colonias de un cultivo puro de cada uno de los 328 aislamientos y se resuspendieron en 200 µL de agua destilada estéril en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml. Cada suspensión se homogeneizó y se llevó a ebullición durante 10 minutos.

A continuación, se separó el ADN genómico de otros componentes celulares, mediante centrifugación a 12.000 rpm durante 10 minutos. Por último, se colectó el sobrenadante que contenía el ADN en un nuevo tubo de 1,5 ml y se cuantificó el material genético en Nanodrop (Thermo Scientific). Cuando fue necesario, y a fin de alcanzar la concentración apropiada para su análisis, se realizó una dilución en agua destilada. Las soluciones de ADN se almacenaron a -20 °C hasta su utilización.

2.3 Identificación de genes asociados a virulencia

Se evaluó la presencia de genes de virulencia característicos de los virotipos ETEC; STEC, EPEC y NTEC. Asimismo, se buscaron genes codificantes para adhesinas y fimbrias, asociadas a las primeras etapas de colonización, y del sideróforo aerobactina, que interviene en el metabolismo del hierro, de cepas de *E. coli* comensales y patógenas extraintestinales.

Los protocolos para la detección del gen codificante para la adhesina F41 y las PCR multiplex para la identificación del virotipo NTEC (*cnf1*, *cnf2*, *cdtIII*, *cdtIV* e *iucD*) y los genes *afa8E*, *papC*, *saa* y *sfaDE* se pusieron a punto en el laboratorio durante el transcurso de esta tesis (Paton y Paton 2002; Van Bost et al. 2003). En estos casos, se seleccionó un producto de PCR del tamaño esperado para cada gen y se secuenció en Macrogen (Corea) para confirmar su identidad. El alineamiento y los análisis de secuencias para confirmar la identidad de los amplicones se realizaron con los programas bioinformáticos BioEdit (versión 7.5.0.3) y BLAST (blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi). El resto de los protocolos ya habían sido puestos a punto previamente en nuestro laboratorio (Umpiérrez 2016). Todas las reacciones incluyeron sus respectivos controles positivos, confirmados previamente por secuenciación, y un control de blanco.

Todos los controles positivos pertenecieron a la colección de cepas de nuestro laboratorio y en algunos casos fueron provistos por VIRBAC-URUGUAY e INIA-La Estanzuela.

2.3.1 Identificación de genes mediante PCR

Mediante PCR convencional se amplificaron secuencias parciales de los genes *f5*, *f17A*, *f17GI*, *f17GII* y *clpG*. Tal como se realizó previamente en nuestro laboratorio, la mezcla de reacción incluyó 0,1 mM de dNTPs, 1,5 mM de MgCl₂, 0,32 μM de cada cebador, 2 ng/ μl de ADN, 1 U de Taq Polimerasa (Invitrogen) y 1x del buffer de la enzima (Umpiérrez 2016). Las condiciones del ciclado fueron: desnaturalización inicial por 5 minutos a 94 °C [desnaturalización: 1 minuto a 94 °C, unión de cebadores: 1 minuto a la temperatura de fusión correspondiente (T_m), extensión: 1 minuto a 72 °C], se realizaron 30 ciclos y una extensión final de 5 minutos a 72 °C. Las temperaturas de desnaturalización utilizadas fueron 61,7 °C, 59 °C, 58 °C, 58 °C, 53 °C y 53 °C para la detección de *clpG*, *f17A*, *f17GII*, *f17GI*, *f5* y *f41* respectivamente.

Las secuencias de los cebadores y el tamaño de los amplicones se muestran en Tabla 2.4.

Tabla 2.4 Cebadores utilizados en las PCR simples

Cebador	Secuencia (5'--3')	Tamaño (pb)
<i>clpG-F</i> ¹	GGGCGCTCTCTCCTTCAAC	403
<i>clpG-R</i> ¹	CGCCCTAATTGCTGGCGAC	
<i>f17A-F</i> ¹	GCAGAAAATTCAATTTATCCTTGG	537
<i>f17A-R</i> ¹	CTGATAAGCGATGGTGTAATTAAC	
<i>f17GII-F</i> ¹	CGTGGGAAATTATCTATCAACG	615
<i>f17G-R</i> ¹	TGTTGATATTCCGTTAACCGTAC	
<i>f17GI-F</i> ¹	CGGAGCTAATACTGCATCAACC	615
<i>f17G-R</i> ¹	TGTTGATATTCCGTTAACCGTAC	
<i>f5-F</i> ²	TATTATCTTAGGTGGTATGG	314
<i>f5-R</i> ²	GGTATCCTTTAGCAGCAGAGTATTC	
<i>f41-F</i> ²	GCATCAGCGGCAGTATCT	380
<i>f41-R</i> ²	GTCCCTAGCTCAGTATTATCACCT	

¹ Bertin 1998; ². Franck, Bosworth y Moon 1998.

2.3.2 Identificación de genes mediante multiplex PCR

Para identificar los virotipos STEC, EPEC, ETEC y NTEC se realizaron cuatro multiplex PCR (Tabla 2.5). La reacción para identificación de EPEC, STEC LEE- y STEC LEE+, previamente descrita por Paton y Paton (2002) consistió en la búsqueda y amplificación de secuencias parciales de genes que codifican para las adhesinas Eae y Saa y las toxinas Stx1, Stx2 y EhxA. El mix de reacción se compuso con 0,2 mM de dNTPs, 3,0 mM de MgCl₂, 0,1 µM de cada cebador, 5 ng/ µl de ADN, 1 U de Taq Polimerasa (Invitrogen) y 1x de buffer de la enzima. Las condiciones de ciclado fueron: desnaturalización inicial por 5 minutos a 94 °C, [desnaturalización: 1 minuto a 94 °C, unión de cebadores: 1 minuto a 53 °C, extensión: 1 minuto a 72 °C], se realizaron 30 ciclos y una extensión final de 5 minutos a 72 °C.

La reacción multiplex para identificar el virotipo ETEC consistió en la búsqueda y amplificación de secuencias parciales de los genes *sta* y *lt*, tal como lo realizó previamente en nuestro laboratorio (Umpiérrez 2016). El mix se preparó con 0,26 mM de dNTPs, 2,6 mM de MgCl₂, 0,4 µM de cada cebador *sta*, 0,48 µM de cada cebador, 10 ng/ µl de ADN, 1,25 U de Taq Polimerasa (Invitrogen) y 1x de buffer de la enzima. Las condiciones de ciclado fueron: 6 minutos a 94 °C, 35 ciclos de [50 segundos a 94 °C, 40 segundos a 57 °C, 50 segundos a 72 °C] y una extensión final de 3 minutos a 72 °C.

Para identificar el virotipo NTEC, se utilizó la reacción desarrollada previamente por Van Bost y colaboradores (2003). La misma se orienta a la búsqueda de secuencias parciales codificantes para las toxinas CdtIII, CdtIV, Cnf1, Cnf2 y el sideróforo IucD. El mix de

reacción se preparó con 4 mM de MgCl₂, 0,4 mM de dNTPs, 0,4 μM de cada cebador, 5 ng/ μl de ADN, 1 U de Taq Polimerasa (Invitrogen) y 1x de buffer de la enzima. Las condiciones de ciclado fueron: desnaturalización inicial por 3 minutos a 94 °C, 30 ciclos de [desnaturalización: 1 minuto a 94 °C, unión de cebadores: 1 minuto a 60 °C, extensión: 1 minuto a 72 °C] y la extensión final de 7 minutos a 72 °C.

Tabla 2.5 Cebadores utilizados en multiplex PCR

Cebador	Secuencia (5'--3')	Tamaño (pb)
<i>saa-F¹</i>	CGTGATGAACAGGCTATTGC	119
<i>saa-R¹</i>	ATGGACATGCCTGTGGCAAC	
<i>ehxA-F¹</i>	GCATCATCAAGCGTACGTTCC	534
<i>ehxA-R¹</i>	AATGAGCCAAGCTGGTTAAGCT	
<i>eae-F¹</i>	GGGATCGATTACCGTCAT	837
<i>eae-R¹</i>	TTTATCAGCCTTAATCTC	
<i>stx1-F¹</i>	CAGTTAATGTGGTGGCGAAGG	348
<i>stx1-R¹</i>	CACCAGACAATGTAACCGCTG	
<i>stx2-F¹</i>	ATCCTATTCCCGGGAGTTTACG	584
<i>stx2-R¹</i>	GCGTCATCGTATACACAGGAGC	
<i>sta-F²</i>	GCTAATGTTGGCAATTTTTATTCTGTGA	190
<i>sta-R²</i>	AGGATTACAACAAAGTTCACAGCAGTAA	
<i>lt-F³</i>	ATTTACGGCGTACTATCCTG	280
<i>lt-R³</i>	TTTTGGTCTCGGTCAGATATG	
<i>cnf2-F⁴</i>	TATCATAACGGCAGGAGGAAGCACC	1,243
<i>cnf2-R⁴</i>	GTCACAATAGACAATAATTTTCCG	
<i>cnf1-F⁴</i>	TTATATAGTCGTCAAGATGGA	760
<i>cnf1-R⁴</i>	CACTAAGCTTTACAATATTGA	
<i>cdtIII-F⁴</i>	GAAAATAAATGGAATATAAATGTCCG	558
<i>cdtIII-R⁴</i>	TTTGTGTCGGTGCAGCAGGGAAAA	
<i>cdtIV-F⁴</i>	CCTGATGGTTCAGGAGGCTGGTTC	350
<i>cdtIV-R⁴</i>	TTGCTCCAGAATCTATACCT	
<i>iucD-F⁴</i>	AAAACCTGACATCGGATGGC	253
<i>iucD-R⁴</i>	GTATTTGTGGCAACGCAGAA	
<i>sfaDE-F⁴</i>	CTCCGGAGAACTGGGTGCATCTTAC	410
<i>sfaDE-R⁴</i>	CGGAGGAGTAATTACAAACCTGGCA	
<i>papC-F⁴</i>	GACGGCTGTACTGCAGGGTGTGGCG	328
<i>papC-R⁴</i>	ATATCCTTTCTGCAGGGATGCAAT A	
<i>afa8E-F⁴</i>	CTAACTTGCCATGCTGTGACAGTA	302
<i>afa8E-R⁴</i>	TTATCCCCTGCTTAGTTGTGAATC	

1. Paton y Paton 1998; 2002; 2. Franck, Bosworth y Moon 1998; 3. Olive 1989; 4. Van Bost et al. 2003.

Por último, para identificar los genes que codifican para las adhesinas Afa8E, PapC y SfaDE, características del gupo ExPEC, se siguió la técnica de PCR multiplex también desarrollada por Van Bost y colaboradores (2003). El mix de reacción incluyó 4 mM de MgCl₂, 0,4 mM de dNTPs, 0,4 μM de cada cebador, 5 ng/ μl de ADN, 1 U de Taq Polimerasa (Invitrogen) y 1x de buffer. El ciclado comenzó con 5 minutos a 95 °C, luego 30 ciclos de [desnaturalización: 1 minuto a 95 °C, unión de cebadores: 1 minuto a 57 °C, extensión: 1 minuto a 72 °C y extensión final durante 7 minutos a 72 °C (Tabla 2.5).

2.3.3 Visualización de los amplicones

Los productos de PCR se sembraron en geles de agarosa de concentración variable (0,8 a 2,0 %) junto al marcador de tamaño molecular 1 kb Plus (Thermo Scientific). Luego de la migración electroforética, los geles se incubaron en solución acuosa con GelRed (Biotum) de manera de lograr la tinción del material genético. Finalmente, los amplicones se observaron bajo luz UV.

2.4 Selección de aislamientos con perfiles de virulencia únicos

Siguiendo el mismo criterio utilizado por Louge (2016), la selección de aislamientos se realizó considerando que las muestras con 2 o más perfiles genéticos diferentes aportan un aislamiento para cada genotipo en particular, independientemente del número de aislamientos positivos para cada perfil de virulencia (Louge 2016). De esta manera, se seleccionaron todos los aislamientos que exhibieron perfiles genéticos de virulencia únicos en la muestra biológica del animal muerto al que pertenecían (Figura 2.1)

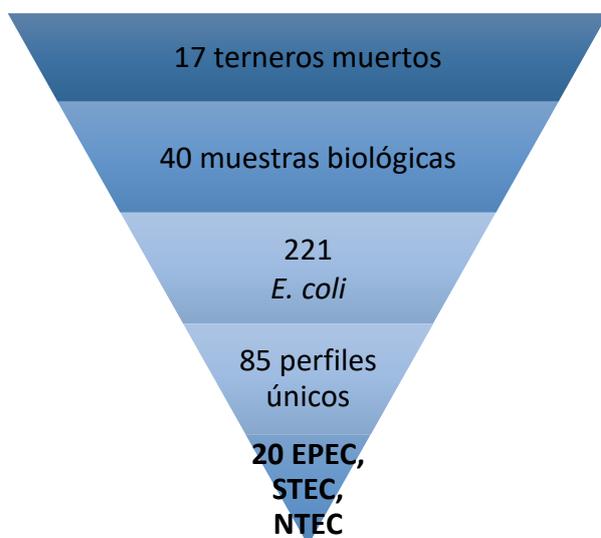


Figura 2.1 Selección de aislamientos de *E. coli* con perfiles únicos de virulencia

2.4.1 *Rep*-PCR y patrones fingerprinting

Mediante la técnica de *rep*-PCR, se evaluó la diversidad intraespecífica de esta colección (Sosa y Zunino 2013; Umpiérrez 2016). La extracción de ADN se realizó por el método de lisis térmica descrito anteriormente. Para la amplificación por PCR se utilizaron los cebadores ERIC1 y ERIC2 (Tabla 2.6) y el termociclador Optimax (Labnet) (Versalovic et al. 1994).

La mezcla de reacción consistió en 0,2 mM de dNTPs, 5 mM de MgCl₂, 3,0 μM de cada cebador, 4 ng/ μl de ADN, 1 U de Taq polimerasa (Invitrogen) y 1x de buffer. Las condiciones de ciclado fueron: desnaturalización inicial por 5 minutos a 94 °C, [desnaturalización: 1 minuto a 94 °C, unión de cebadores: 2 minutos a 40 °C y extensión: 8 minutos a 65 °C], se realizaron 40 ciclos y una extensión final de 16 minutos a 65 °C. Los productos de PCR se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1 % y 110 V durante 3 hs. Previo a la visualización de las bandas en luz UV, los geles se incubaron durante 40 minutos en colorante GelRed (Biotum) y se lavaron 5 minutos en agua destilada para eliminar el exceso de colorante. Para estimar el tamaño de los amplicones se utilizó el marcador 1 Kb Plus (Thermo Scientific).

El análisis de los patrones de bandas se realizó con el programa bioinformático GelCompar II (Applied Maths, Versión 6.5). A partir de las bandas obtenidas se construyeron dendogramas utilizando el método UPGMA y el coeficiente Dice, con una optimización del 3 % y una tolerancia del 1 %. De acuerdo a lo propuesto por Chandran y Mazumder (2014), los aislamientos con un coeficiente de similitud $\geq 75\%$ se asignaron a la misma variante genética, mientras que aquellos con coeficiente $\geq 98\%$ se consideraron clones (Chandran y Mazumder 2014).

Tabla 2.6 Cebadores utilizados en *Rep*-PCR

Cebador	Secuencia (5'--3')
<i>ERIC-1</i> ¹	ATGTAAGCTCCTGGGGATTCAAC
<i>ERIC-2</i> ¹	AAGTAAGTGAAGTGGGGTGAGCCG

1. Versalovic et al. 1994.

2.5 Selección de aislamientos con perfiles de virulencia característicos

Posteriormente, se realizó un segundo tamizaje de la colección que consistió en seleccionar aquellos aislamientos que, de acuerdo a los perfiles de virulencia, podían categorizarse dentro de alguno de los virotipos estudiados. En esta oportunidad, se incluyeron los animales muertos y los vivos (**Figura 2.2**). A este grupo ($n = 25$), se le realizó estudios para asignación de grupo filogenético, serogrupo y resistencia a antibióticos. Para aquellos aislamientos que resultaron resistentes a quinolonas se efectuó la búsqueda e identificación de genes PMQR. Además, en los aislamientos clasificados como STEC se realizó la subtipificación de las Stx. Finalmente, se realizó la tipificación molecular por PFGE.

2.5.1 Subtipificación de Stx

La subtipificación de las Stx se realizó siguiendo el procedimiento propuesto por Scheutz y colaboradores (2012), previamente puesto a punto en nuestro laboratorio (Ernst 2017). Mediante PCR a tiempo final, se evaluó la presencia de genes codificantes para los subtipos de Stx1: *stx1a*, *stx1c* y *stx1d* (Tabla 2.7).

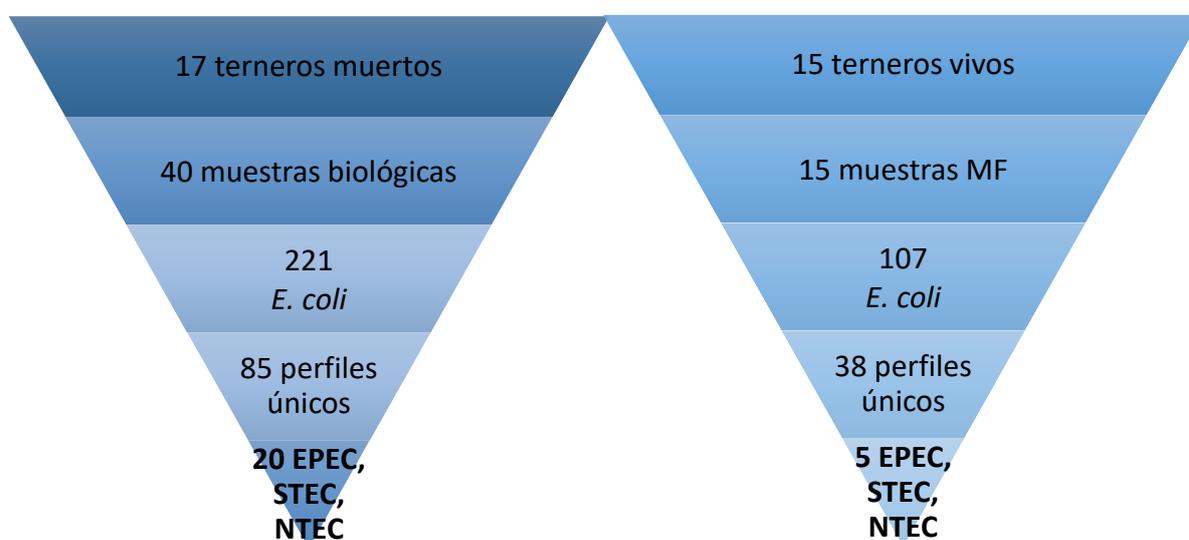


Figura 2.2 Selección de perfiles únicos de virulencia con genes característicos de virotipos de *E. coli*

Tabla 2.7 Cebadores utilizados para subtipificación de *stx1*

Cebador	Secuencia (5'--3')	Tamaño (pb)
<i>stx1a-F</i> ¹	CCTTTCCAGGTACAACAGCGGTT	478
<i>stx1a-R</i> ¹	GGAAACTCATCAGATGCCATTCTGG	
<i>stx1c-F</i> ¹	CCTTTCCTGGTACAACACTGCGGTT	252
<i>stx1c-R</i> ¹	CAAGTGTTGTACGAAATCCCCCTCTGA	
<i>stx1d-F</i> ¹	CAGTTAATGCGATTGCTAAGGAGTTTACC	203
<i>stx1d-R</i> ¹	CTCTTCCTCTGGTTCTAACCCCATGATA	

1. Scheutz et al. 2012.

El mix de reacción incluyó 0,4 mM dNTPs, 3 mM de MgCl₂, 1,6 µM de cada cebador de *stx1a* o 0,8µM de cada cebador de *stx1c* o *stx1d*, 5 ng/ µl de ADN, 1 U de Taq Polimerasa (Invitrogen) y 1x de buffer de la enzima. Las condiciones de ciclado fueron: extensión inicial: 8 minutos a 95 °C, 35 ciclos [extensión: 50 segundos a 95 °C, unión de cebadores: 40 segundos a 66 °C, extensión: 1 minutos a 72 °C] y extensión final: 9 minutos a 72 °C.

Los controles positivos y negativos utilizados para esta reacción pertenecían al cepario de nuestro laboratorio.

2.5.2 Asignación de grupo filogenético

Tal como lo describió Clermont y colaboradores (2013) para la asignación de grupo filogenético se amplificaron secuencias parciales de genes marcadores: *chuA*, *yjaA*, *TspE4.C2* y *arpA*. Una reacción PCR multiplex para búsqueda e identificación de estos genes permitió asignar los aislamientos a grupos A, B1, B2, C, D, E, F y Clado I (Clermont et al. 2013; Cardozo 2020).

El mix de reacción incluyó 0,2 mM dNTPs, 1,5 mM MgCl₂, 0,32 µM de cada cebador de *chuA*, *yjaA*, *TspE4.C2* y 0,64 µM de cada cebador de *arpA*, 8 ng/ µl de ADN, 2 U de Taq Polimerasa (Invitrogen) y 1x de buffer de la enzima. Las condiciones de ciclado fueron: desnaturalización inicial durante 4 minutos a 94 °C, 30 ciclos de [desnaturalización: 5 segundos a 94 °C, unión de cebadores: 20 segundos a 59 °C, extensión: 20 segundos a 72 °C] y una extensión final de 5 minutos a 72 °C. Las secuencias de los cebadores utilizados en esta reacción se indican en la Tabla 2.8.

Tabla 2.8 Cebadores utilizados para la asignación de grupo filogenético

Cebador	Secuencia (5'--3')	Tamaño (pb)
<i>chuA-F</i> ¹	ATGGTACCGGACGAACCAAC	288
<i>chuA-R</i> ²	TGCCGCCAGTACCAAAGACA	
<i>yjaA-F</i> ¹	CAAACGTGAAGTGTCAGGAG	211
<i>yjaA-R</i> ¹	AATGCGTTCCTCAACCTGTG	
<i>TspE4.C2-R</i>	CACTATTCGTAAGGTCATCC	152
<i>TspE4.C2-F</i>	AGTTTATCGCTGCGGGTCGC	
<i>arpA-F</i> ¹	AACGCTATTCGCCAGCTTGC	400
<i>arpA-R</i> ¹	TCTCCCCATACCGTACGCTA	
<i>arpA'-F</i> ³	GATTCCATCTTGTCAAAATATGCC	301
<i>arpA'-R</i> ³	GAAAAGAAAAAGAATTCCCAAGAG	
<i>trpA-F</i> ⁴	AGTTTTATGCCAGTGCGAG	219
<i>trpA-R</i> ⁴	TCTGCGCCGGTCACGCC	

1. Clermont, 2013; 2. Clermont, 2000; 3. Clermont, 2004; 4. Lescat, 2009.

Cuando fue necesaria la confirmación de filogrupos E y C, se realizó una PCR simple utilizando el mismo mix y condiciones de ciclado de la reacción multiplex. Los cebadores utilizados fueron *trpAR* y *trpAR*, o *arpA'F* y *arpA'R* para la asignación al grupo C o E respectivamente (Tabla 2.8). La visualización de los amplicones se realizó como se describió previamente

Los controles positivos y negativos utilizados para esta reacción pertenecían al cepario de nuestro laboratorio.

2.5.3 Asignación de serogrupo

Siguiendo la técnica desarrollada por Paddock y colaboradores (2012), se realizaron PCR simples para amplificar secuencias génicas que codifican regiones O-antigénicas correspondientes a los serogrupos O157, O26, O45, O103, O111, O121 y O145 (Paddock et al. 2012). La mezcla de reacción incluyó: 0,1 mM de dNTPs, 1,5 mM de MgCl₂, 0,36 μM de cada cebador, 2 ng/ μl de ADN, 1 U de Taq Polimerasa (Invitrogen) y 1x de buffer de la enzima. Las condiciones del ciclado fueron: desnaturalización inicial por 5 minutos a 94 °C, [desnaturalización: 30 segundos 94 °C, unión de cebadores y extensión: 80 segundos a 67 °C], se realizaron 25 ciclos y la extensión final fue de 7 minutos a 68 °C. Las características de los cebadores utilizados en cada reacción se detallan en la Tabla 2.9.

Tabla 2.9 *Cebadores utilizados para identificación de serogrupo*

Cebador	Secuencia (5'--3')	Tamaño (pb)
<i>O26-F¹</i>	GGGGGTGGGTTACTATATTGG	241
<i>O26-R¹</i>	AGCGCCTATTTTCAGCAAAGA	
<i>O45-F¹</i>	GGGCTGTCCAGACAGTTCAT	890
<i>O45-R¹</i>	TGTACTGCACCAATGCACCT	
<i>O103-F¹</i>	TAAGTACGGGGGTGCTTTTT	716
<i>O103-R¹</i>	AAGCTCCCGAGCACGTATAA	
<i>O111-F¹</i>	CAAGAGTGCTCTGGGCTTCT	451
<i>O111-R¹</i>	AACGCAAGACAAGGCAAAAC	
<i>O121-F¹</i>	TCATTAGCGGTAGCGAAAGG	587
<i>O121-R¹</i>	TTCTGCATCACCAGTCCAGA	
<i>O145-F¹</i>	TGCTCGACTTTTACCATCAAC	374
<i>O145-R¹</i>	AACCAACACCATACACCTTGTCTT	
<i>O157-F²</i>	CAGGTGAAGGTGGAATGGTTGTC	296
<i>O157-R²</i>	TTAGAATTGAGACCATCCAATAAG	

1. Paddock et al. 2012; 2. Bai, Shi y Nagaraja 2010.

Los controles positivos y negativos utilizados para esta reacción pertenecían al cepario de nuestro laboratorio.

2.5.4 Resistencia a los antimicrobianos de uso común en la clínica veterinaria

La totalidad de los aislamientos seleccionados ($n = 25$) se estudiaron para determinar su perfil de resistencia a 14 antibióticos. Adicionalmente, para aquellos aislamientos que resultaron resistentes a quinolonas, se realizó una búsqueda y amplificación de genes PMQR. Todos los ensayos de resistencia a antibióticos y búsqueda de genes transferibles de resistencia se realizaron en el marco de una pasantía de investigación en el Dpto. de Bacteriología y Viriología del Instituto de Higiene. La misma fue realizada bajo la orientación de la Dra. Inés Bado.

2.5.4.1 Evaluación de la resistencia mediante disco difusión en agar

Para evaluar la susceptibilidad a los antimicrobianos se realizó el método de Disco difusión en agar, descrito previamente por Bauer y colaboradores (Bauer et al. 1978). Para cada aislamiento seleccionado, se testaron 14 antibióticos: ampicilina (AMP), ceftazidima (CAZ), ceftriaxona (CRO), amoxicilina-ácido clavulánico (AMC), cefuroxima (CXM), cefepime (FEP), ácido nalidíxico (NAL), enrofloxacin (ENR), ciprofloxacina (CIP), amikacina (AK), gentamicina (GEN), tobramicina (TOB),

estreptomicina (STR) y trimetoprim-sulfametoxazol (SXT). El control de calidad se realizó utilizando la cepa de *E. coli* ATCC (American-Type Culture Collection) 25922.

Brevemente, se realizaron suspensiones bacterianas de cada uno de los aislamientos en suero fisiológico estéril y se ajustaron de acuerdo al estándar de turbidez 0,5 de la escala de Mc. Farland. Con un hisopo estéril humedecido en cada suspensión bacteriana se realizó una siembra extendida en tres direcciones en placas de agar Müeller Hinton de modo de cubrir toda la superficie del agar. Luego, se colocaron en cada placa los discos antibióticos (Oxoid). Las placas se incubaron a 37 °C, durante 24 hs en aerobiosis. Transcurrido este tiempo, se midieron los diámetros de las zonas de inhibición del crecimiento y las cepas se interpretaron como sensibles, intermedias o resistentes a cada antimicrobiano según las categorías establecidas por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (Clinical y Laboratory Standards Institute 2018).

Para detectar aislamientos con fenotipo BLEE se utilizó el método de doble disco. El disco de cefalosporina de tercera generación (CAZ y CRO), se colocó próximo al disco de AMC. La deformación del halo de la cefalosporina, producido por el ácido clavulánico, indica la presencia de una cepa productora de BLEE.

2.5.4.2 Detección de genes plasmídicos asociados a resistencia a quinolonas (PMQR)

De acuerdo a las resistencias a quinolonas observadas en algunos aislamientos, se procedió a la búsqueda e identificación de genes PMQR en 21 aislamientos.

Mediante PCR simple se amplificaron secuencias parciales de los genes *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrE*, *qnrVC* y *aac* (Tabla 2.10). La mezcla de reacción incluyó 0,2 mM de dNTPs, 2,0 mM de MgCl₂, 0,5 µM de cada cebador, 5 ng/ µl de ADN, 2,5 U de Taq Polimerasa (Invitrogen) y 1x del buffer de la enzima. Las condiciones del ciclado fueron: desnaturalización inicial por 5 minutos a 94 °C, [desnaturalización: 1 minuto a 94°C, unión de cebadores: 1 minuto a la temperatura de fusión correspondiente (T_m), extensión: 1 minuto a 72°C], se realizaron 30 ciclos y una extensión final de 5 minutos a 72°C. Las temperaturas de desnaturalización de los cebadores fueron 53 °C, 52 °C, 50 °C, 51 °C, 53 °C, 46 °C y 55 °C para *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrE*, *qnrVC* y *aac* respectivamente. Las secuencias de los cebadores se muestran en la Tabla 2.10.

Tabla 2.10 Cebadores para identificación de genes plasmídicos asociados a resistencia a quinolonas

Cebador	Secuencia (5'--3')	Tamaño (pb)
<i>qnrA-F</i> ¹	ATTTCTCACGCCAGGATTTG	516
<i>qnrA-R</i> ¹	GATCGGCAAAGGTTAGGTCA	
<i>qnrB-F</i> ¹	GATCGTGAAAGCCAGAAAGG	469
<i>qnrB-R</i> ¹	ACGACGCCTGGTAGTTGTCC	
<i>qnrC-F</i> ⁵	GGGTTGTACATTTATTGAATC	307
<i>qnrC-R</i> ⁵	CACCTACCCATTTATTTTCAG	
<i>qnrD-F</i> ⁴	CGAGATCAATTTACGGGGAATA	580
<i>qnrD-R</i> ⁴	AACAAGCTGAAGCGCCTG	
<i>qnrS-F</i> ¹	ACGACATTCGTCAACCTGCAA	417
<i>qnrS-R</i> ¹	TAAATTGGCACCCTGTAGGC	
<i>qnrVC-F</i> ³	ATGGAAAAATCAAAGCAATT	656
<i>qnrVC-R</i> ³	TTAGTCAGGAACAATGAT	
<i>aac-F</i> ²	TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA	481
<i>aac-R</i> ²	CTCGAATGCCTGGCGTGTTT	

1. Robicsek et al. 2006; 2. Park et al. 2006; 3. Liu, Wong y Chen 2013; 4. Cavaco et al. 2009; 5. Hong et al. 2009.

La electroforesis de los productos de PCR se realizó en geles de agarosa al 1 %. Tras la migración, los geles se tiñeron con solución acuosa de GelRed para visualizar los amplicones, tal como se describió anteriormente. Todas las reacciones incluyeron sus respectivos controles positivos, provistos por el Dpto. de Bacteriología y Virología del Instituto de Higiene (UdelaR), y un control de blanco.

Cuando hubo amplificación de un producto de tamaño esperado, se secuenció en Macrogen (Corea) para confirmar su identidad. El alineamiento y análisis de secuencias se realizó utilizando el programa BLAST (blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi).

2.5.5 Tipificación molecular mediante PFGE

Para determinar la relación clonal entre los aislamientos se realizó la técnica de PFGE, de acuerdo al protocolo establecido por PulseNet (CDC PulseNet 2017) y tal como se realizó previamente por Bado (2017). El ensayo se realizó en el marco de una pasantía realizada en el Dpto. de Bacteriología y Virología del Instituto de Higiene (UdelaR), bajo la orientación de la Dra. Inés Bado.

Los aislamientos seleccionados ($n = 25$) se cultivaron en medio TSA, durante 24 hs, a 37 °C y en atmósfera aerobia. Luego, se prepararon suspensiones celulares equivalentes a 7,4 de la escala Mc. Farland en 3 ml de Buffer de Suspensión Celular (BSC) (100 mM de

Tris, 100 mM de EDTA, pH 8.0). Las suspensiones se conservaron en hielo hasta su procesamiento. Para el armado de los bloques, se preparó una suspensión con 150 µl de agarosa para PFGE *Low Melting* (Agarose LF AMRESCO) al 1 % preparada con SDS (1 %) en Buffer Tris EDTA (TE) (10 mM de Tris, 1 mM de EDTA, pH 8), 150 µl de suspensión celular y 25 µl de Proteinasa K 20 mg/ ml (Proteinase K, BioLabs, New England). Luego de la solidificación, los bloques se transfirieron a un tubo Falcon de 15 ml que contenía 2 ml de buffer de lisis (BL) (50 mM de Tris, 50 mM de EDTA, pH 8.0, sarcosina 1 %) y 25 µl de proteínasa K (20 mg/ ml).

Los bloques, contenidos en el BL, se incubaron a 55 °C de temperatura con agitación en baño de agua durante 18 hs. Finalizado el tiempo de incubación, se retiró el BL y se realizaron dos lavados con agua mQ y tres con buffer TE. Para cada lavado se utilizaron 10 ml de líquido y se incubaron en baño a 55 °C con agitación durante 15 minutos cada uno. Los bloques se conservaron en 5 ml de buffer TE en heladera a 4 °C hasta la digestión; para este paso, los bloques se cortaron a un tamaño de 2 mm x 10 mm y se incubaron con la enzima de restricción *XbaI* (Thermo Scientific) durante 18 hs a 37 °C. Como cepa control se utilizó *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Braenderup H9812, que se procesó de la misma manera que los aislamientos. Posteriormente, se preparó un gel de agarosa, al 1 % en TBE, con los bloques incorporados en uno de los extremos. Para la corrida electroforética se utilizó un equipo CHEF DRII System (BioRad). Las corridas electroforéticas se realizaron en las condiciones recomendadas para *E. coli* O157:H7: 6 V/cm de voltaje, 14 °C de temperatura y durante 18 hs; el primer pulso fue de 2,2 segundos y el último de 54,2 (CDC PulseNet 2017).

Luego de la migración, el gel se incubó en una solución de BrEt (1 µg/ ml) durante 30 minutos y se lavó con agua mQ durante 10 minutos. Para observar el patrón de bandas de ADN, el gel se visualizó bajo iluminación UV. Los perfiles de restricción se analizaron con el programa bioinformático GelCompar II (Applied Maths, Versión 6.5). A partir de el patrón de bandas obtenido, se construyeron dendogramas utilizando el método UPGMA y el coeficiente Dice, con una optimización del 1 % y una tolerancia del 1 %. Las cepas cuyos perfiles de restricción tuvieron un coeficiente de similitud mayor o igual a 85 % se consideraron genéticamente relacionadas mientras que aquellas con coeficiente de 100 % se consideraron clones (Ejrnaes et al. 2006).

2.6 Análisis estadísticos

Con el fin de evaluar la asociación entre la presencia de los genes de virulencia ensayados y el origen de los aislamientos (intestinal o extraintestinal) y/o la condición clínica de los animales (vivos o muertos) se utilizó el test de Odds Ratio (OR), considerando significancia estadística cuando el p-valor fue menor que 0,05 (Cerdeira, Vera y Rada 2013).

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

$$H' = \sum_{i=1}^S p_i * \ln p_i$$

Donde, S es el número de variantes genéticas únicas y p_i es el cociente entre el número de aislamientos compartiendo el mismo genotipo (i) y el total de aislamientos y \ln el logaritmo neperiano.

3 Presentación de resultados

En la primera sección se exhiben los resultados de la búsqueda e identificación de genes de virulencia característicos de los virotipos de *E. coli*, de aislamientos intestinales y extraintestinales. La segunda sección muestra los resultados del estudio de diversidad intraespecífica (*rep*-PCR) realizado a todos los aislamientos recuperados de animales muertos y con perfiles genéticos de virulencia únicos. Finalmente, se exhiben los estudios complementarios realizados a los aislamientos con genes característicos de los virotipos EPEC, ETEC y NTEC.

3.1 Puesta a punto de reacciones de PCR

Previo al estudio de los aislamientos de *E. coli*, fue necesario poner a punto las reacciones de PCR orientadas a detectar y amplificar los genes *iucD*, *afa8E*, *f41*, *papC*, *saa*, *sfaE*, *cdtIII*, *cdtIV*, *cnf1*, *cnf2* y *ehxA*, tal como se describió en el capítulo metodológico. Para cada PCR, se comprobó la correcta amplificación mediante la secuenciación del producto del tamaño esperado. En todos los genes se obtuvo una identidad igual o superior al 98% entre la secuencia del producto de PCR y la secuencia publicada correspondiente.

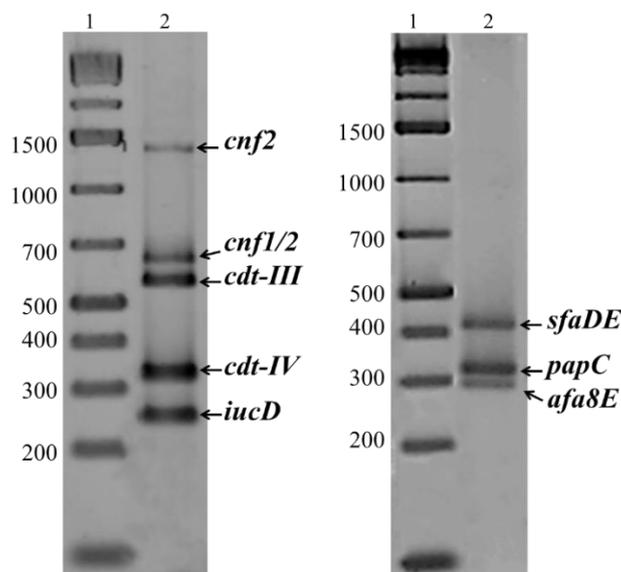


Figura 3.1 Productos de amplificación de secuencias parciales de genes de virulencia

Geles de agarosa al 1,8 % teñidos con GelRed. Izquierda: amplificación parcial de genes *iucD*, *cdtIII*, *cdtIV*, *cnf1* y *cnf2*. Derecha: amplificación de secuencias parciales de los genes *afa8E*, *papC* y *sfaDE*. Carril 1 de cada gel: marcador de tamaño molecular 1 Kb Plus (Thermofisher). Las flechas señalan el producto esperado.

A modo ilustrativo, en la Figura 3.1 se visualizan los productos de las reacciones multiplex PCR utilizadas para la detección del virotipo NTEC.

3.2 Detección e identificación de genes de virulencia en *E. coli*

Mediante la técnica de PCR, se estudió la presencia de 21 genes de virulencia de *E. coli*, característicos de los virotipos intestinales y del grupo ExPEC. Se estudiaron 221 aislamientos provenientes de 17 animales muertos y 107 recuperados de 15 animales que vivían en 3 de los establecimientos con casos de mortalidad.

3.2.1 Ocurrencia y diversidad de genes de virulencia en animales muertos

Como se describió en el capítulo anterior, los aislamientos fueron recuperados por personal de INIA-La Estanzuela a partir del cultivo de 40 muestras biológicas pertenecientes a 17 terneros.

El 88 % de los animales ($n = 15$) presentaron al menos un aislamiento positivo a los genes de virulencia estudiados (Figura 3.2). Se determinó la presencia de 13 diferentes genes de virulencia en aislamientos de *E. coli* recuperados de 32 muestras biológicas, es decir que en 8 muestras diferentes no se detectaron genes. Los aislamientos recuperados de orina, riñón, corazón y líq. cefalorraquídeo resultaron negativos a todos los genes testeados.

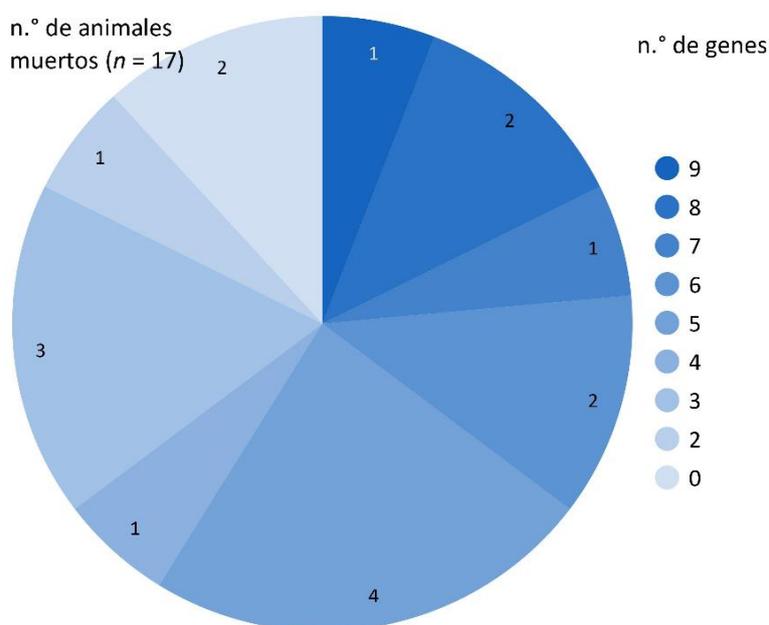


Figura 3.2 Cantidad de genes de virulencia identificados en animales muertos

($n = 17$)

En el 5,9 % de los animales ($n = 1$) se detectaron 9, 7, 4 y 2 genes de virulencia. Un 11,8 % de los animales ($n = 2$) presentaron 8 y 6 genes y el mismo porcentaje no amplificó ningún gen (animales 4 y 5). En el 17,6 % de los animales ($n = 3$) se identificaron 3 genes de virulencia y en el 23,5 % ($n = 4$) se identificaron 5 genes (Figura 3.2).

Entre los genes identificados se destacan aquellos que caracterizan a los patotipos intestinales EPEC, STEC, y NTEC (Tabla 3.9). El gen que se identificó con mayor frecuencia entre los animales ($n = 17$) fue *iucD*, amplificando en el 82 % de los terneros ($n = 14$). La frecuencia observada para *f17A* y *papC* fue del 59 % ($n = 10$), para *afa8E* del 53 % ($n = 9$), *ehxA* 47 % ($n = 8$), *eae* 41 % ($n = 7$), *stx1* 35 % ($n = 6$), *clpG* 24 % ($n = 4$), *f17GI* y *f17GII* de 18 % ($n = 3$), *cdtIII* y *cnf1* 12 % ($n = 2$) y *cnf2* 6 % ($n = 1$) (Figura 3.3). En ningún animal se detectó la presencia de *f41*, *saa*, *sfaDE*, *cdtIV*, *lt*, *sta* o *stx2*.

En todos los animales con al menos un aislamiento positivo a los genes testeados, se identificaron *E. coli* con dos o más genes característicos de ExPEC y cepas comensales (*iucD*, *afa8E*, *clpG*, *f17A*, *papC*, *cdtIII*, *cnf1*). Entre estos aislamientos, estuvieron aquellos caracterizados como EPEC, NTEC y STEC. Los perfiles genéticos de virulencia de todos los aislamientos se presentan en la Tabla 7.1 (Anexo A.)

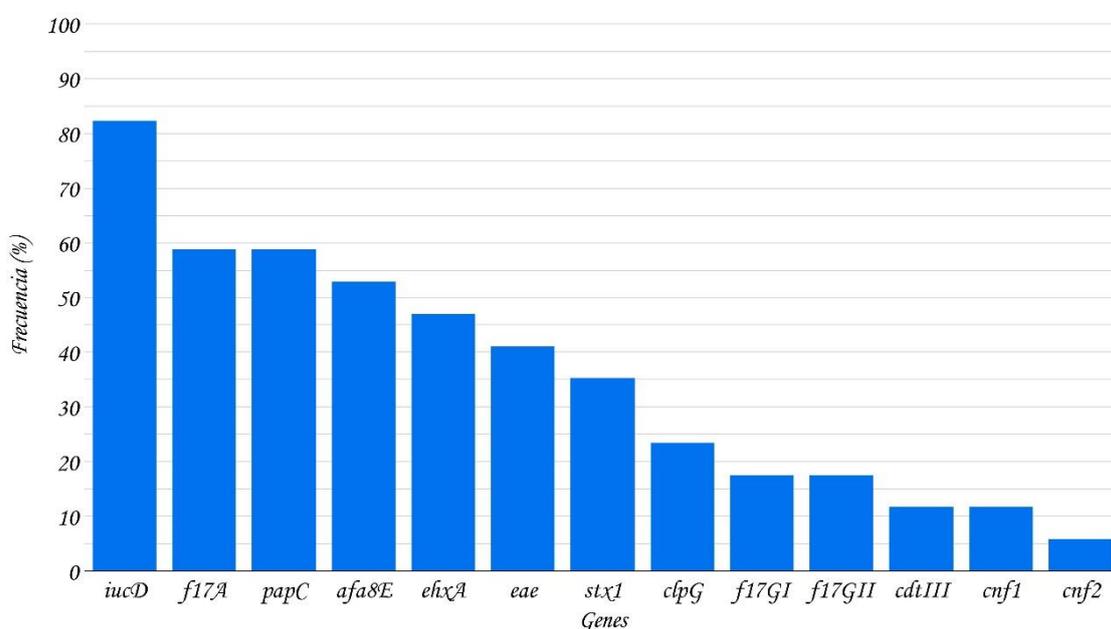


Figura 3.3 Frecuencia de ocurrencia de genes de virulencia de *E. coli* en animales muertos ($n = 17$)

Mediante el índice de Shannon, se evaluó la diversidad de genes identificados en los animales. Se consideraron las diferentes muestras biológicas de cada animal y la cantidad de genes diferentes identificados en cada muestra. En la Tabla 3.1 se observan los valores calculados.

Finalmente, mediante el test de Odds Ratio (OR), se determinó que en los animales existió una asociación en la ocurrencia de los genes *stx1*, *eae*, *ehxA* en simultáneo (OR = 44; 95% CI, 2,90 - 667,17).

3.2.1.1 Ocurrencia y diversidad de genes de virulencia en aislamientos intestinales y extraintestinales

De acuerdo a la procedencia, los aislamientos se diferenciaron en intestinales y extraintestinales. Los aislamientos intestinales incluyeron aquellos recuperados del intestino y MF, mientras que el resto de los aislamientos, provenientes de cerebro, líquido cefalorraquídeo, corazón, pulmón, hígado, LNM, bazo, vejiga, orina y riñón, se agruparon como extraintestinales. De esta manera, se diferenciaron 10 animales con aislamientos intestinales y 13 con aislamientos extraintestinales.

En la Figura 3.4 se muestra la frecuencia de detección de los genes de virulencia en los animales con aislamientos intestinales y extraintestinales. A excepción de los genes *cnf1* y *cnf2*, que solo se detectaron en aislamientos intestinales, el resto de los genes se identificaron en el ambiente intestinal y extraintestinal.

Tabla 3.1 Diversidad de genes de virulencia y muestras biológicas en animales muertos

Animal	N.º muestras biológicas	N.º genes totales	H'
12	2	9	0,2
1	2	7	0,3
7	2	9	0,3
14	2	10	0,3
8	3	5	0,3
16	3	10	0,4
10	3	14	0,5
3	3	14	0,5
15	6	27	0,8

H': Índice de Shannon. Los animales 2, 6, 9, 11, 13 y 17 tuvieron una sola muestra biológica e índices H' = 0. Los animales 4 y 5 fueron negativos a todos los genes testeados.

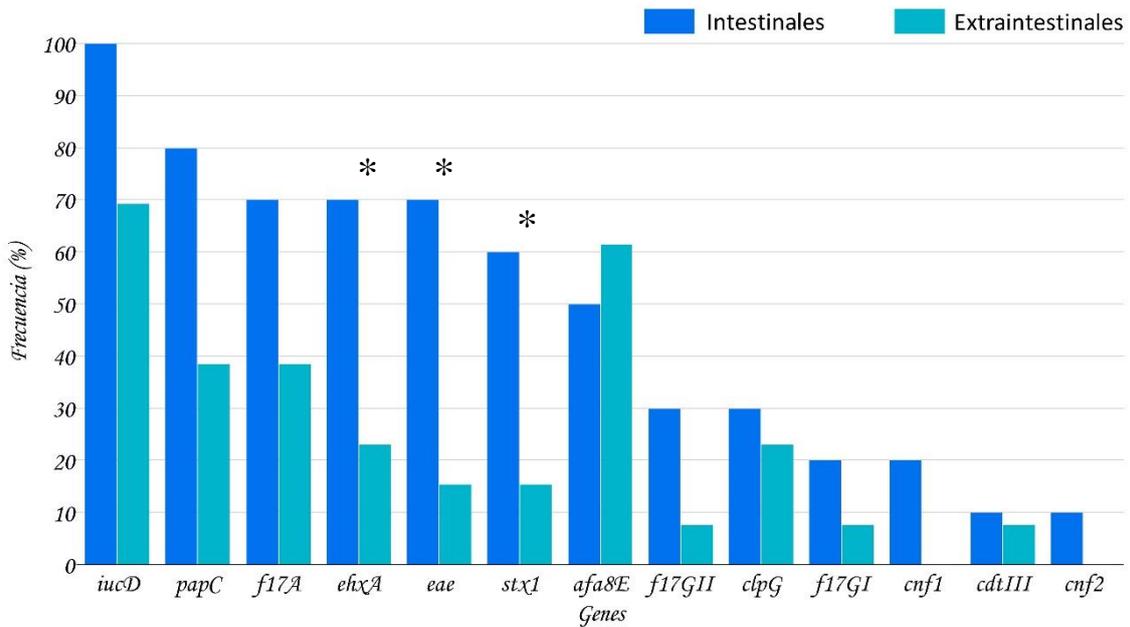


Figura 3.4 Comparación de la frecuencia de genes de virulencia en el ambiente intestinal ($n = 10$) y extraintestinal ($n = 13$) animales muertos

* Indica los genes con diferencias significativas entre las diferentes muestras

El gen *afa8E* exhibió menor frecuencia en los animales con muestras intestinales ($n = 10$) que extraintestinales ($n = 13$). Por el contrario, el resto de los genes se detectó en mayor frecuencia animales con aislamientos intestinales que extraintestinales (Figura 3.4). La frecuencia fue *iucD* fue del 100 % en animales con muestras intestinales ($n = 10$) y 69 % aquellos con muestras extraintestinales ($n = 9$), la de *papC* fue del 80 % ($n = 8$) y 38 % ($n = 5$), *f17A* fue del 70 % ($n = 7$) y 38 % ($n = 5$), *ehxA* 70 % ($n = 7$) y 23 % ($n = 3$), *eae* 70 % ($n = 7$) y 15 % ($n = 2$), *stx1* 60 % ($n = 6$) y 15 % ($n = 2$), *afa8E* 50 % ($n = 5$) y 62 % ($n = 8$), *f17GII* 30 % ($n = 3$) y 8 % ($n = 1$), *clpG* 30 % ($n = 3$) y 23 % ($n = 3$), *f17GI* 20 % ($n = 2$) y 8 % ($n = 1$), *cnf1* 20 % ($n = 2$) y 0 % ($n = 0$), *cdtIII* 10 % ($n = 1$) y 8 % ($n = 1$) y *cnf2* 10 % ($n = 1$) y 0 % ($n = 0$), para los animales con muestras intestinales y extraintestinales respectivamente (Figura 3.4).

Los genes *stx1*, *eae* y *ehxA* estuvieron significativamente más representados en los animales con aislamientos intestinales que extraintestinales (OR = 8,25; IC 95 %, 1,15 - 59,01; OR = 12,83; IC 95 %, 1,69 - 97,20 y OR = 7,78; IC 95 %, 1,20 - 50,43, respectivamente) (Figura 3.4).

3.2.1.2 Perfiles de virulencia en aislamientos provenientes de animales muertos

En los animales muertos ($n = 17$), se identificaron aislamientos de *E. coli* con hasta 11 perfiles diferentes de virulencia diferentes. Como se observa en la Tabla 3.2, entre los aislamientos recuperados de animales muertos ($n = 221$), se identificaron 37 perfiles genéticos únicos de virulencia más 1 sin genes identificados. De los 13 animales muertos que tuvieron aislamientos positivos a alguno de los genes *stx1*, *eae* o *ehxA*, 8 animales tenían aislamientos positivos a los tres genes en simultáneo. Los genes más representados en los perfiles fueron *iucD*, *papC*, *afa8E*, *eae*, *stx1* y *ehxA*. Del total de perfiles positivos a *iucD* ($n = 27$), el 93 % ($n = 25$) tuvieron alguno de los genes codificantes para las adhesinas identificadas (*clpG*, *afa8E*, *papC* o *f17A*). Finalmente, un 28 % ($n = 7$) de los perfiles con *iucD* y alguna de las adhesinas, incluyó alguna de las toxinas identificadas (*stx1*, *cnf1* y *cnf2* y *cdtIII*) (Tabla 3.2).

De los 37 perfiles que incluyeron algún gen positivo, 9 se identificaron tanto en el ambiente intestinal como extraintestinal, 15 sólo en el ambiente intestinal y 13 sólo en el ambiente extraintestinal.

Todos los animales con aislamientos positivos a los genes testeados ($n = 15$), tuvieron aislamientos con 2 o más genes característicos de ExPEC (Tabla 3.2). En el 62 % de las *E. coli* recuperadas del ambiente extraintestinal ($n = 81$), se identificaron 2 o más genes característicos de ese grupo. Estos aislamientos pertenecieron a los 11 animales con aislamientos extraintestinales positivos a alguno de los genes testeados. Por otro lado, en el 68 % ($n = 62$) de las *E. coli* recuperadas del ambiente intestinal, también se identificaron 2 o más genes característicos de ExPEC. Estos aislamientos pertenecieron a 10 de los 11 con aislamientos intestinales (Tabla 3.2).

3.2.2 Ocurrencia de genes de virulencia en animales vivos

Los 15 animales vivos que vivían en establecimientos con casos de mortalidad, presentaron al menos un aislamiento positivo a los genes de virulencia estudiados.

Tabla 3.2 Perfiles de virulencia en animales muertos ($n = 17$)

Perfil de virulencia	% animales (n)
<i>iucD/ afaE</i>	35 (6)
<i>iucD/ eae/ ehxA/ stx1</i>	24 (4)
<i>iucD/ papC</i>	18 (3)
<i>eae/ ehxA/ stx1</i>	12 (2)
<i>iucD/ afaE/ clpG/ f17A</i>	12 (2)
<i>iucD/ afaE/ f17A/ f17GII</i>	12 (2)
<i>iucD/ afaE/ f17A/ f17GII/ papC</i>	12 (2)
<i>iucD/ f17A/ f17GI</i>	12 (2)
<i>afaE/ clpG</i>	6 (1)
<i>cdtIII/ ehxA/ papC</i>	6 (1)
<i>clpG/ f17A/ f17GI</i>	6 (1)
<i>eae/ ehxA</i>	6 (1)
<i>ehxA</i>	6 (1)
<i>f17A</i>	6 (1)
<i>f17A/ f17GI</i>	6 (1)
<i>f17A/ f17GII</i>	6 (1)
<i>iucD</i>	6 (1)
<i>iucD/ afaE/ clpG</i>	6 (1)
<i>iucD/ afaE/ clpG/ f17A/ papC</i>	6 (1)
<i>iucD/ afaE/ clpG/ papC</i>	6 (1)
<i>iucD/ afaE/ eae/ ehxA/ stx1</i>	6 (1)
<i>iucD/ afaE/ eae/ stx1</i>	6 (1)
<i>iucD/ afaE/ f17A</i>	6 (1)
<i>iucD/ afaE/ f17A/ papC</i>	6 (1)
<i>iucD/ afaE/ papC</i>	6 (1)
<i>iucD/ clpG</i>	6 (1)
<i>iucD/ clpG/ f17A/ papC</i>	6 (1)
<i>iucD/ clpG/ papC</i>	6 (1)
<i>iucD/ eae/ cnf1/ ehxA/ stx1</i>	6 (1)
<i>iucD/ eae/ cnf1/ stx1</i>	6 (1)
<i>iucD/ eae/ ehxA</i>	6 (1)
<i>iucD/ ehxA/ stx1</i>	6 (1)
<i>iucD/ f17A/ f17GII</i>	6 (1)
<i>iucD/ f17A/ f17GII/ cnf2/ cnf1/ cdtIII</i>	6 (1)
<i>iucD/ f17A/ f17GII/ papC</i>	6 (1)
<i>iucD/ f17A/ papC</i>	6 (1)
<i>papC</i>	6 (1)
*	53 (9)

n = cantidad de animales que presentaron aislamientos con ese perfil de virulencia. El 53 % de los animales presentó aislamientos en los que no se detectó ninguno de los genes estudiados.

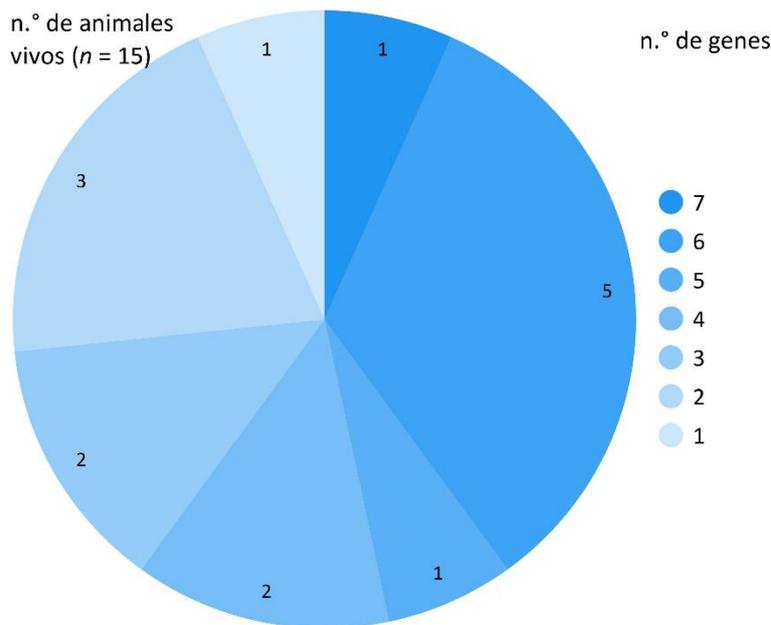


Figura 3.5 Cantidad de genes de virulencia identificados en animales vivos ($n = 15$)

En el 6,7 % de los animales ($n = 1$) se identificaron 7, 5 y 1 gen de virulencia, en 13,3 % ($n = 2$) se detectaron 4 y 3 genes, en el 20,0 % ($n = 3$) se identificaron 2 genes y en el 33,3 % de los animales ($n = 5$) se detectaron 6 genes de virulencia (Figura 3.5).

3.2.2.1 Perfiles de virulencia de animales vivos

Los aislamientos de *E. coli* recuperados de muestras de MF exhibieron 23 perfiles únicos de virulencia más 1 en el que no se identificaron ninguno de los genes estudiados (Tabla 3.3). Los perfiles genéticos predominantes incluyeron los genes *iucD*, *papC*, *f17A* y *f17GII*. En cada animal vivo, se detectaron entre 2 y 4 perfiles de virulencia (combinación única de genes por aislamiento). Al igual que en los animales muertos, los virotipos identificados en esta colección de aislamientos incluyeron EPEC, STEC y NTEC, en efecto, 14 de los perfiles coincidieron entre ambos grupos (Tabla 3.3).

De los 15 animales vivos, 13 contenían en su ambiente intestinal *E. coli* con genes característicos de ExPEC y cepas comensales (*iucD*, *afa8E*, *papC*, *clpG*, *cdtIII*, *cnf1* y *f17A*). En estos mismos aislamientos, también se identificaron genes característicos de EPEC, NTEC y STEC (Tabla 3.3).

Tabla 3.3 Perfiles de virulencia identificados en MF de animales vivos ($n = 15$)

Perfil de virulencia	% de animales (n)
<i>f17A/f17GII</i>	18 (3)
<i>iucD/afaE/clpG/f17A/f17GII</i>	18 (3)
<i>iucD/papC</i>	18 (3)
<i>afaE/clpG</i>	12 (2)
<i>afaE/clpG/papC</i>	12 (2)
<i>clpG</i>	12 (2)
<i>iucD/clpG/papC</i>	12 (2)
<i>afaE</i>	6 (1)
<i>clpG/papC</i>	6 (1)
<i>eae/ehxA/stx1</i>	6 (1)
<i>f17A</i>	6 (1)
<i>iucD/afaE/clpG/eae/papC/ehxA</i>	6 (1)
<i>iucD/afaE/clpG/f17A/f17GII/papC</i>	6 (1)
<i>iucD/afaE/f17A/f17GII/cnf2/cnf1/cdtIII</i>	6 (1)
<i>iucD/afaE/f17A/f17GII/papC</i>	6 (1)
<i>iucD/afaE/papC</i>	6 (1)
<i>iucD/clpG</i>	6 (1)
<i>iucD/clpG/f17A/f17GII/papC</i>	6 (1)
<i>iucD/eae/ehxA</i>	6 (1)
<i>iucD/f17A/f17GI</i>	6 (1)
<i>iucD/f17A/f17GII</i>	6 (1)
<i>iucD/f17A/f17GII/cnf2/cnf1/cdtIII</i>	6 (1)
<i>papC</i>	6 (1)
*	18 (3)

n = cantidad de animales que presentaron aislamientos con ese perfil de virulencia. * El 18 % de los animales presentó aislamientos en los que no se detectó ninguno de los genes estudiados.

3.2.2.2 Ocurrencia de los genes en toda la colección de aislamientos provenientes de animales muertos y vivos ($n = 32$)

Considerando los animales muertos y vivos ($n = 17 + 15$), en el 93,7 % de ellos ($n = 30$) se identificó al menos un gen de virulencia. En el 3,1 % de los animales ($n = 1$) se detectaron 9 y 0 genes de virulencia, en el 6,3 % ($n = 2$) se identificaron 8, 7, y ningún gen, en 9,4 % ($n = 3$) 4 genes, en el 12,5 % ($n = 4$) 2 genes, en el 15,6 % ($n = 5$) se identificaron 5 y 3 genes y en el 21,9 % ($n = 7$) se detectaron 6 genes de virulencia (Figura 3.6).

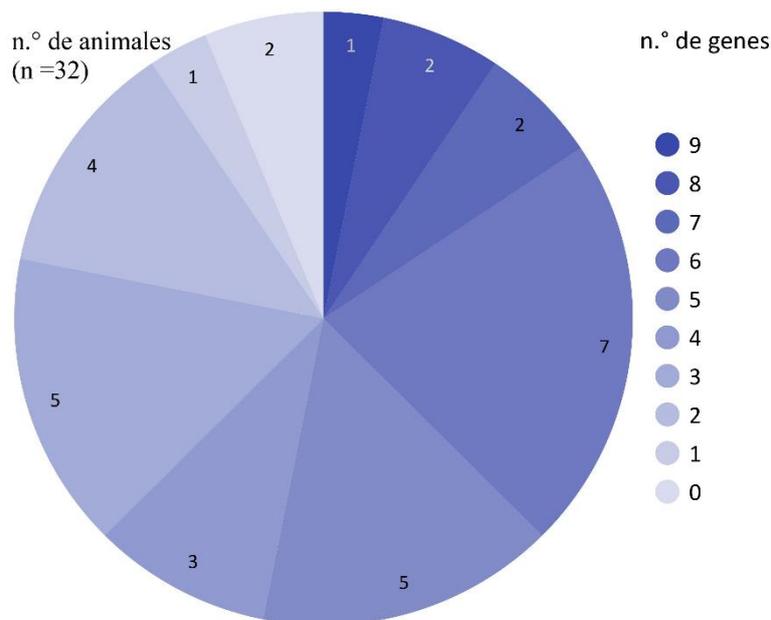


Figura 3.6 Cantidad de genes identificados en todos los animales

Teniendo en cuenta los animales muertos y vivos, la ocurrencia de los genes *clpG* y *f17GII* fue significativamente menor en animales muertos (OR = 0,21; IC 95 %, 0,04 - 0,94 y OR = 0,19; IC 95 %, 0,04 - 0,94 respectivamente) (Figura 3.7). Asimismo, comparando sólo aquellos animales muertos con aislamientos extraintestinales y los animales vivos, la ocurrencia de *f17GII* fue significativamente menor en los animales muertos (OR = 0,08; IC 95 %, 0,01 - 0,78). Finalmente, se calcularon los ORs entre el grupo de animales muertos con aislamientos intestinales ($n = 10$) y los animales vivos ($n = 15$). En este caso, se observaron frecuencias significativamente mayores para los genes *stx1*, *ehxA* y *eae* provenientes de animales muertos (OR = 21; IC 95 %, 1,92 - 229,40; OR = 15,17; IC 95 %, 2,03 - 113,35 y OR = 15,17; IC 95 %, 2,03 - 113,35, respectivamente) (Figura 3.4 y Figura 3.7).

3.2.3 Establecimientos con muestreo de animales muertos y vivos

En esta sección se analizó de manera independiente cada establecimiento en los que se estudiaron animales vivos y muertos.

Como se observa en la Tabla 3.4, todos los terneros presentaron un conjunto de genes diferente. Es de destacar que, debido al escaso número de animales en cada establecimiento, las pruebas estadísticas realizadas se hicieron en base a la presencia de genes en los aislamientos.

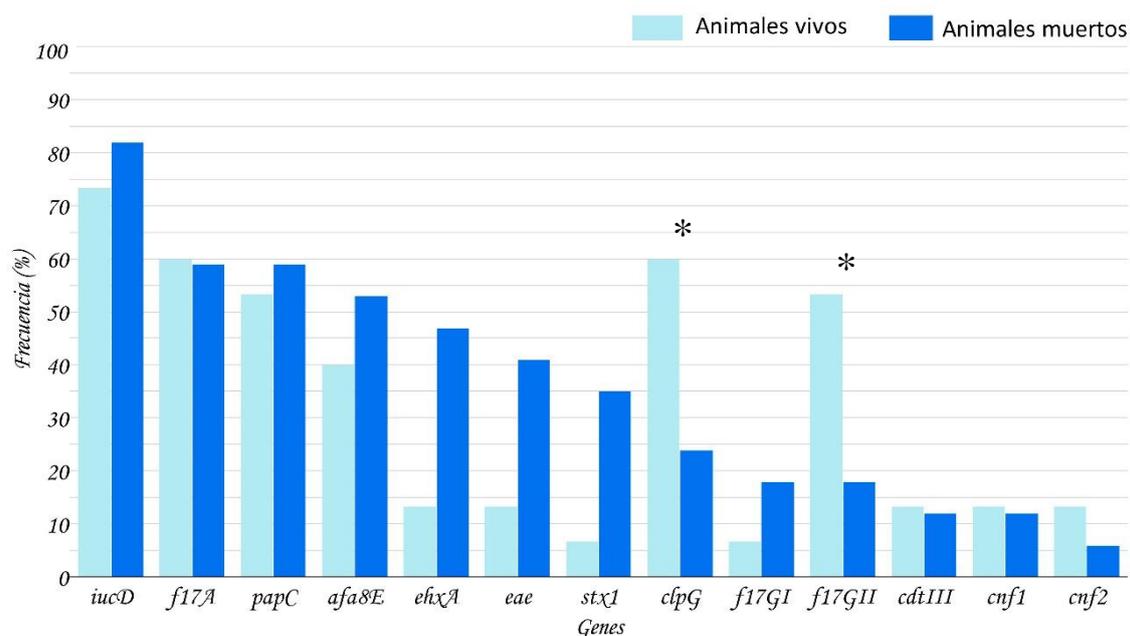


Figura 3.7 Frecuencia de genes de virulencia en animales vivos y muertos ($n = 32$)

* Indica los genes con diferencias significativas entre los grupos de animales

En el establecimiento F (animal muerto 6 y animales vivos 18 al 21), 2 de los 4 genes identificados en el animal muerto (*ehxA* y *eae*) no se identificaron en los animales vivos (Tabla 3.4). En cuanto a los genes que estuvieron presentes en aislamientos provenientes del animal muerto y de los vivos (*iucD* y *papC*), no se determinaron diferencias en su frecuencia de aparición.

En el caso del establecimiento K (animal muerto 14 y animales vivos del 22 al 29), el gen *f17GI* solo estuvo presente en el animal muerto. La ocurrencia de los genes *iucD*, *papC*, y *clpG* fue significativamente mayor en los aislamientos recuperados del animal muerto que de los animales vivos (OR = 74,77; IC 95 %, 9,13 - 612,28, OR = 14,52; IC 95 %, 3,78 - 55,80 y OR = 66,29; IC 95 %, 3,82 - 1149,61, respectivamente). Además, la ocurrencia del gen *f17A* fue significativamente menor en los aislamientos recuperados del animal muerto que de los vivos (OR = 0,26; IC 95 %, 0,07 - 0,98).

Por último, en el establecimiento M (animal muerto 16 y animales vivos del 29 al 32), todos los genes que se encontraron en el animal muerto, también se identificaron en alguno de los animales vivos. No obstante, el gen *afa8E* tuvo una presencia significativamente mayor en los aislamientos del animal muerto (OR = 45,00; IC 95 %, 2,07 - 977,47).

Tabla 3.4 Genes de virulencia identificados en animales muertos y vivos que convivían en un mismo establecimiento

Establecimiento	Animal	Perfil de virulencia
F	6(*)	<i>eae/ ehxA/ iucD/ papC</i>
	18	<i>clpG/ f17A/ f17GII/ iucD/ papC/ afa8E</i>
	19	<i>clpG/ iucD</i>
	20	<i>f17A/ f17GII/ f17GI/ iucD</i>
	21	<i>clpG/ f17A/ f17GII/ iucD/ papC/ afa8E</i>
K	14(*)	<i>clpG/ f17A/ f17GI/ iucD/ papC/ afa8E</i>
	22	<i>f17A</i>
	23	<i>f17A/ f17GII/ cnf2/ cnf1/ cdtIII/ iucD/ afa8E</i>
	24	<i>f17A/ f17GII</i>
	25	<i>clpG/ papC/ afa8E</i>
	26	<i>clpG/ papC</i>
	27	<i>clpG/ iucD/ papC</i>
	29	<i>clpG/ f17A/ f17GII/ iucD/ papC/ afa8E</i>
M	16(*)	<i>f17A/ f17GII/ eae/ stx1/ ehxA/ iucD/ papC/ afa8E</i>
	29	<i>eae/ stx1/ ehxA/ iucD</i>
	30	<i>clpG/ f17A/ f17GII/ iucD/ papC</i>
	31	<i>f17A/ f17GII/ cnf2/ cnf1/ cdtIII/ iucD</i>
	32	<i>clpG/ eae/ ehxA/ iucD/ papC/ afa8E</i>

(*) Animales muertos

3.3 Selección de aislamientos con perfiles de virulencia únicos

A continuación, se seleccionaron todos los aislamientos que se diferenciaron en sus perfiles de virulencia y en la muestra biológica del animal muerto al que pertenecieron. De esta manera, las 40 muestras biológicas provenientes de los 17 animales muertos, tuvieron al menos un aislamiento incluido en el estudio de *rep*-PCR. Dependiendo de la cantidad de perfiles de virulencia identificados en cada muestra, se incluyeron entre 1 y 4 aislamientos por muestra. Respecto al origen geográfico, 61 pertenecieron a animales de Colonia, 7 provenían de Río Negro, 14 de San José y 3 de Canelones. En la Tabla 7.1 (Anexo A. Perfiles genéticos de virulencia se muestran los perfiles de virulencia y el origen de los aislamientos seleccionados).

3.3.1 Diversidad intraespecífica de la colección

El análisis de ERIC-PCR se realizó a la selección de 85 aislamientos de *E. coli*, provenientes de animales muertos, con perfiles únicos en las muestras de las que habían sido recuperados (Tabla 7.1, Anexo A). Tres de los aislamientos inicialmente seleccionados (3.5, 3.8 y 3.14), resultaron con patrones de menos de 6 bandas y no se incluyeron en el análisis de dendogramas.

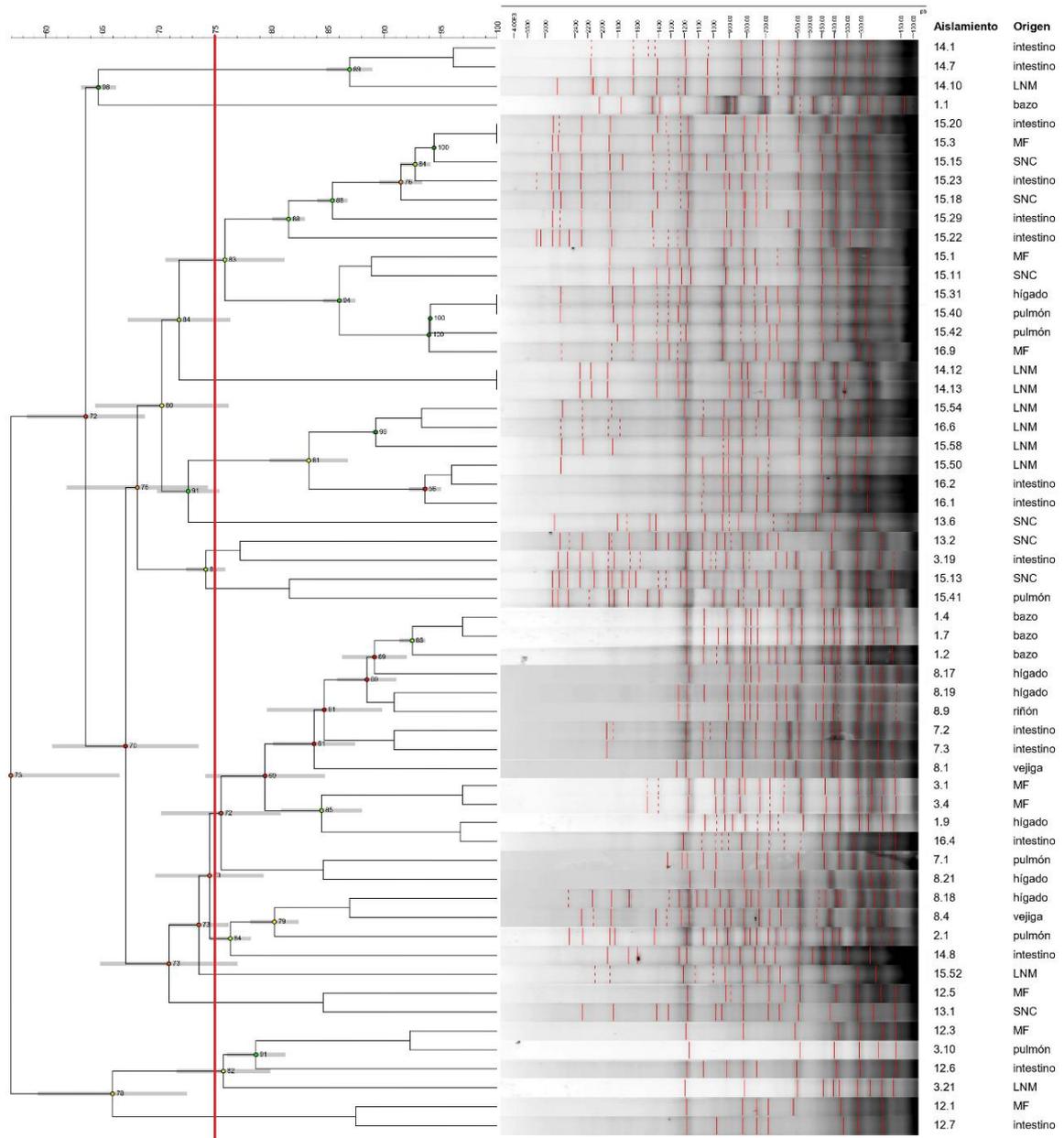


Figura 3.8 Dendrograma de los aislamientos del departamento de Colonia ($n = 61$)

Dendrograma realizado con el programa GelCompar II (Applied Maths, Versión 6.5), método UPGMA, coeficiente Dice, optimización del 3 % y tolerancia del 1 %. La línea roja marca el punto de corte utilizado para definir las variantes.

A partir de los patrones de bandas obtenidos tras la electroforesis en geles de agarosa de los productos del *rep-PCR*, se generaron dendogramas con el programa GelCompar II (Applied Maths, Versión 6.5), utilizando el método UPGMA, tal como se describe en el capítulo metodológico. El dendograma completo se muestra en la Figura 8.1 (Anexo B). En la Figura 3.10, Figura 3.8, Figura 3.9 y Figura 3.11, se ilustran los dendogramas obtenidos para cada Departamento.

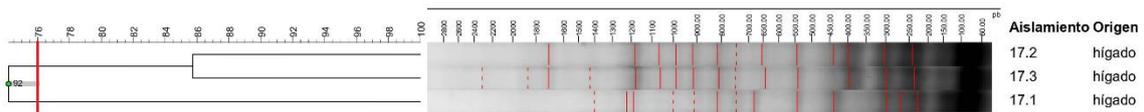


Figura 3.9 Dendograma de los aislamientos del departamento de Canelones ($n = 3$)

Dendograma realizado con el programa GelCompar II (Applied Maths, Versión 6.5), método UPGMA, coeficiente Dice, optimización del 3 % y tolerancia del 1 %. La línea roja marca el punto de corte utilizado para definir las variantes.

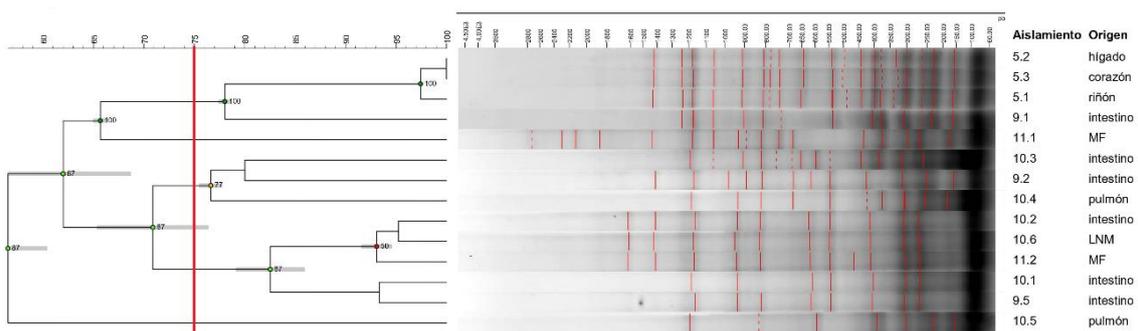


Figura 3.10 Dendograma de los aislamientos del departamento de San José ($n = 14$)

Dendograma realizado con el programa GelCompar II (Applied Maths, Versión 6.5), método UPGMA, coeficiente Dice, optimización del 3 % y tolerancia del 1 %. La línea roja marca el punto de corte utilizado para definir las variantes.

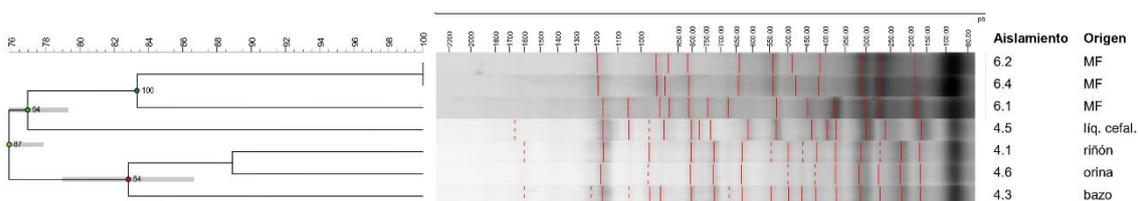


Figura 3.11 Dendograma de los aislamientos del departamento de Río Negro ($n = 7$)

Dendograma realizado con el programa GelCompar II (Applied Maths, Versión 6.5), método UPGMA, coeficiente Dice, optimización del 3 % y tolerancia del 1 %.

Considerando las diferentes variantes genéticas y el número de aislamientos únicos obtenidos tras el análisis, se calculó el índice H'. Como se observa en la Tabla 3.5, en los Departamentos los índices variaron entre 0,28 y 0,97. Los índices que indican mayor diversidad se observaron en los Departamentos que presentaban mayor cantidad de aislamientos (Tabla 3.5).

Los aislamientos provenientes de muestras extraintestinales ($n = 48$) se agruparon en 47 aislamientos únicos con 15 variantes genéticas. Por otro lado, en los aislamientos intestinales ($n = 37$), se identificaron 32 aislamientos únicos y 11 variantes. De acuerdo al índice H', la diversidad fue mayor en los aislamientos extraintestinales ($H' = 1,02$) respecto a los intestinales ($H' = 0,92$) (Tabla 3.6).

En los animales, la cantidad de aislamientos estudiados varió entre 1 y 18, se determinaron entre 1 y 16 aislamientos únicos para cada animal y entre 1 y 4 variantes genéticas. El H' varió entre 0 y 0,6. El animal 15 presentó la mayor cantidad de aislamientos únicos. Sin embargo, la mayor diversidad se encontró en el animal 4 ($H' = 0,6$) (Tabla 3.7). Los animales 2, 6 y 7 tuvieron índices de cero.

Al analizar toda la colección ($n = 83$), se identificaron 77 aislamientos únicos agrupados en 16 variantes genéticas. En la Figura 3.8, Figura 3.9, Figura 3.11, Figura 3.12 y Figura 8.1, se puede observar que aislamientos recuperados de un mismo animal, e incluso de la misma muestra biológica, se agrupan en diferentes variantes. En contraposición, se identificaron aislamientos pertenecientes a una misma variante recuperados de distintas muestras biológicas, animales, departamentos y en diferente año de muestreo (Figura 8.1). El índice de Shannon para toda la colección fue de 1,07. Si bien este resultó el valor más alto, de acuerdo a los parámetros establecidos, los valores obtenidos pueden interpretarse como una baja diversidad de los aislamientos.

Tabla 3.5 *Diversidad de los aislamientos recuperados en los Departamentos*

Departamento	N° aislamientos únicos	N° variantes	H'
Colonia	55	14	0,97
San José	13	5	0,62
Canelones	3	2	0,28
Rio Negro	6	1	0,00

H': índice de Shannon.

Tabla 3.6 Diversidad genética de aislamientos recuperados de diferentes ambientes

Ambiente	N° aislamientos únicos	N° variantes	H'
Extraintestinal	47	15	1,02
Intestinal	32	11	0,92

H': índice de Shannon.

Tabla 3.7 Diversidad genética de los aislamientos en los animales

Animal	N° aislamientos únicos	N° variantes	H'
1	5	2	0,22
3	5	4	0,58
4	4	4	0,60
5	2	2	0,30
8	7	2	0,18
9	3	3	0,48
10	6	3	0,44
11	2	2	0,30
12	5	2	0,29
13	3	3	0,48
14	5	3	0,41
15	16	4	0,48
16	5	2	0,22
17	3	2	0,28

H': índice de Shannon. Los animales 2, 6 y 7 tuvieron H = 0.

Tabla 3.8 Origen de los clones

Clon	Aislamiento	Origen
1	5.2	hígado
	5.3	corazón
2	6.2	MF
	6.4	
3	10.5	pulmón
	12.3	MF
4	14.12	LNM
	14.13	
5	15.20	intestino
	15.3	MF
6	15.31	hígado
	15.40	pulmón

MF: materia fecal; LNM: linfonodo mesentérico.

Finalmente, la mayoría de los clones identificados mediante esta técnica se conformaron por aislamientos intestinales o extraintestinal de un mismo animal. Sin embargo, el clon N° 3 se conformó con aislamientos provenientes de diferente animal, muestra biológica y departamento (Tabla 3.8; Tabla 2.1).

3.4 Selección de aislamientos con perfiles de virulencia característicos ($n = 25$)

A partir de toda la colección de aislamientos de animales muertos y vivos ($n = 328$), se seleccionaron aquellos con perfiles de virulencia únicos y genes característicos de los virotipos EPEC, STEC y NTEC ($n = 25$) (Tabla 3.9). A este grupo se les realizó estudios para determinar el filogrupo, serogrupo, perfil de sensibilidad a los antibióticos, búsqueda e identificación de genes PMQR y diversidad intraespecífica. En el caso de las STEC, también se buscaron e identificaron los subtipos *stx1a* y *stx1b* y *stx1c*.

Tabla 3.9 Origen y perfil genético de virulencia de los aislamientos seleccionados

Aislamiento	Origen	Perfil de virulencia	Virotipo
3.1		<i>eae/ stx1/ ehxA/ cnf1/ iucD</i>	STEC LEE+
3.4	MF	<i>eae/ stx1/ ehxA</i>	STEC LEE+
3.19		<i>eae/ stx1/ cnf1/ iucD</i>	STEC LEE+/ NTEC
6.2	MF	<i>eae/ ehxA/ iucD</i>	EPEC
6.4		<i>eae/ ehxA</i>	EPEC
9.5	intestino	<i>eae/ stx1/ ehxA/ iucD</i>	STEC LEE+
10.2	intestino	<i>eae/ stx1/ ehxA/ iucD</i>	STEC LEE+
10.4	pulmón	<i>eae/ stx1/ ehxA/ iucD</i>	STEC LEE+
10.6	LNM	<i>eae/ stx1/ ehxA/ iucD</i>	STEC LEE+
11.2	MF	<i>eae/ stx1/ ehxA/ iucD</i>	STEC LEE+
12.1	MF	<i>f17A/ f17GII/ cnf1/ cnf2/ cdtIII/ iucD</i>	NTEC
15.1	MF	<i>eae/ stx1/ ehxA/ iucD</i>	STEC LEE+
15.3		<i>eae/ stx1/ ehxA/ iucD/ afa8E</i>	STEC LEE+
15.11		<i>eae/ stx1/ ehxA/ iucD</i>	STEC LEE+
15.13	cerebro	<i>eae/ stx1/ ehxA/ iucD/ afa8E</i>	STEC LEE+
15.15		<i>eae/ stx1/ iucD/ afa8E</i>	STEC LEE+
15.31	hígado	<i>eae/ stx1/ ehxA/ iucD</i>	STEC LEE+
15.40		<i>eae/ stx1/ ehxA/ iucD</i>	STEC LEE+
15.42	pulmón	<i>stx1/ ehxA/ iucD</i>	STEC LEE-
16.9	MF	<i>eae/ stx1/ ehxA</i>	STEC LEE+
23.10	MF	<i>f17A/ f17GII/ cnf1/ cnf2/ cdtIII/ iucD/ afa8E</i>	NTEC
29.1	MF	<i>eae/ stx1/ ehxA</i>	STEC LEE+
29.4	MF	<i>eae/ ehxA/ iucD</i>	EPEC
31.1	MF	<i>f17A/ f17GII/ cnf1/ cnf2/ cdtIII/ iucD</i>	NTEC
32.1	MF	<i>clpG/ eae/ ehxA/ iucD/ papC/ afa8E</i>	EPEC

MF: materia fecal; LNM: linfonodo mesentérico.

3.4.1 Tipificación de Stx1

Los 18 aislamientos caracterizados como STEC se estudiaron para subtipificación de las Stx. Como se mencionó en la sección anterior, todos los genes *stx* identificados correspondieron al tipo *stx1*. Siguiendo el procedimiento previamente desarrollado por Scheutz (2012), se realizaron estudios para identificar los genes codificantes de subtipos de Stx1: Stx1a, Stx1c y Stx1d.

Respecto a las variantes estudiadas, 17 aislamientos amplificaron secuencias genéticas codificantes tanto para Stx1a como para Stx1c, y sólo un aislamiento resultó negativo a ambos. Ningun aislamiento fue positivo para el subtipo Stx1d (Tabla 3.10).

Tabla 3.10 Caracterización molecular de los aislamientos STEC, EPEC y NTEC seleccionados

Aislamiento	Virotipo	Filogrupo	Subtipo de Stx1	Serogrupo
3.1	STEC LEE+/ NTEC	A	a y c	n/d
3.4	STEC LEE+	A	a y c	n/d
3.19	STEC LEE+/ NTEC	A	a y c	n/d
6.2	EPEC	E	n/a	n/d
6.4	EPEC	E	n/a	n/d
9.5	STEC LEE+	E	a y c	n/d
10.2	STEC LEE+	E	a y c	n/d
10.4	STEC LEE+	B1	a y c	n/d
10.6	STEC LEE+	E	a y c	n/d
11.2	STEC LEE+	E	a y c	n/d
12.1	NTEC	B1	n/a	n/d
15.1	STEC LEE+	B1	a y c	O111
15.3	STEC LEE+	C	a y c	O111
15.11	STEC LEE+	B1	a y c	O111
15.13	STEC LEE+	C	a y c	O111
15.15	STEC LEE+	C	a y c	O111
15.31	STEC LEE+	B1	a y c	O111
15.40	STEC LEE+	B1	n/d	O111
15.42	STEC LEE-	B1	a y c	O111
16.9	STEC LEE+	B1	a y c	O111
23.10	NTEC	B1	n/a	n/d
29.1	STEC LEE+	B1	a y c	O111
29.4	EPEC	E	n/a	O26
31.1	NTEC	B1	n/a	n/d
32.1	EPEC	E	n/a	O26

n/a: no aplica; n/d: no determinado

3.4.2 Asignación de grupo filogenético

Mediante la técnica descrita por Clermont y colaboradores (2013) se amplificaron secuencias parciales de genes marcadores que permiten la asignación de *E. coli* a los filogrupos A, B1, B2, C, D, E, F y Clado I. Los aislamientos seleccionados ($n = 25$), se agruparon en los filogrupos A, B1, C y E. El grupo más prevalente entre los aislamientos fue el B1, identificándose en 11 aislamientos (44 %) pertenecientes a 7 animales (54 %). El grupo E, se identificó en 8 aislamientos (32 %) recuperados de 6 animales (46 %). Los grupos A y C fueron representados cada uno con 3 aislamientos (12 %) y a un animal (8 %) respectivamente (Tabla 3.10).

Mientras que los aislamientos recuperados del ambiente extraintestinal se agruparon en los filogrupos B1 y C, los intestinales se asignaron a los filogrupos A, B1, y E. Las STEC agruparon en B1, C y E, las EPEC en E, las NTEC en B1 y los aislamientos híbridos NTEC/STEC pertenecieron al grupo A (Tabla 3.10).

3.4.3 Determinación de serogrupo

Mediante la técnica de PCR a tiempo final, se amplificaron secuencias génicas parciales codificantes de regiones O-antigénicas. Se testearon únicamente los serogrupos: O157, O26, O45, O103, O111, O121 y O145, de acuerdo a la técnica descrita por Paddock y colaboradores (2012).

El 40 % de los aislamientos ($n = 10$), provenientes de 3 animales, resultaron positivos a la amplificación del serogrupo O111. Adicionalmente, un 8 % ($n = 2$), pertenecientes a dos animales, se asignaron al serogrupo O26. En el 52 de los aislamientos ($n = 13$) no se determinó ninguno de los serogrupos testeados (Tabla 3.10).

3.4.4 Resistencia a antibióticos y búsqueda de PMQR

A todos los aislamientos de *E. coli* seleccionados ($n = 25$ de $n = 328$) se les realizaron estudios de susceptibilidad a antibióticos. Sólo aquellos que mostraron resistencia a quinolonas se estudiaron para la búsqueda e identificación de genes PMQR.

3.4.4.1 Perfil de sensibilidad a los antibióticos

Mediante el método de Disco-Difusión de Kirby-Bauer en agar Müeller-Hinton, se evaluó la resistencia a 14 antibióticos. La Figura 3.12 muestra la frecuencia de identificación de resistencias en los aislamiento.

Todos los aislamientos ($n = 25$) presentaron resistencia a al menos uno de los antibióticos testeados. El 92 % de los aislamientos mostró resistencia a los antibióticos AMP y STR ($n = 23$), el 84 % a CIP ($n = 21$), el 76 % a NAL ($n = 19$), el 64 % a ENR ($n = 16$), el 24 % a GEN y SXT ($n = 6$), el 16 % a TOB ($n = 4$) y el 12 % a AMC y CXM ($n = 3$) (Figura 3.12 y Tabla 3.11).

Los aislamientos recuperados de animales muertos ($n = 20$) exhibieron resistencia con hasta 9 de los antimicrobianos testeados, mientras que los recuperados de animales vivos ($n = 5$) exhibieron resistencia con hasta 6 antimicrobianos. A excepción de dos animales vivos, todos presentaron aislamientos multirresistentes, es decir que exhibieron resistencia a al menos 3 clases de antibióticos. En particular, la prevalencia de aislamientos resistentes a la AMP, STR y alguna de las quinolonas testeadas (ENR, CIP y NAL) fue del 72%. Por otro lado, no se determinaron resistencias a CAZ, CRO, FEP y AK (Tabla 3.11). Finalmente, ninguno de los aislamientos fue capaz de producir BLEE.

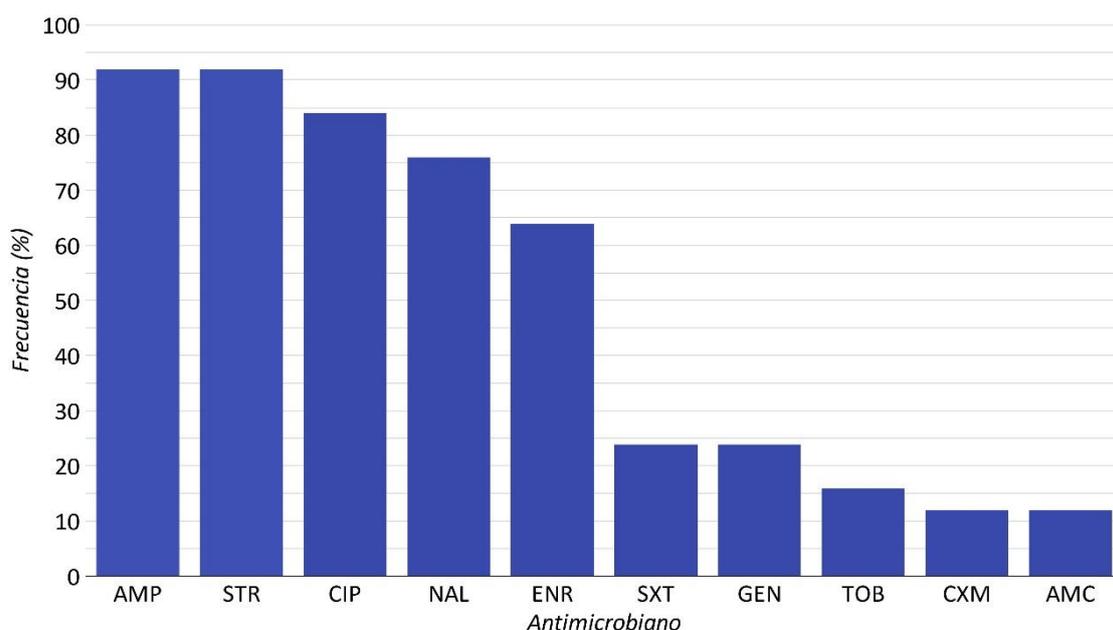


Figura 3.12 Frecuencia de detección de aislamientos resistentes a los antimicrobianos

($n = 25$)

AMP: ampicilina, AMC: amoxicilina-ácido clavulánico, CXM: cefuroxima, NAL: ácido nalidíxico, ENR: enrofloxacin, CIP: ciprofloxacina, GEN: gentamicina, TOB: tobramicina, STR: estreptomicina y SXT: trimetoprim sulfametoxazol.

3.4.5 Resistencia a quinolonas

Como se expuso en el apartado anterior, un subgrupo de 21 aislamientos exhibió resistencia a las quinolonas testeadas (CIP y NAL). Para determinar la presencia de genes plasmídicos asociados a este tipo de resistencia se realizaron los ensayos de PCR descritos en el capítulo metodológico.

En 14 aislamientos se comprobó la presencia del gen *qnrB*, mientras que todos resultaron negativos a los genes *qnrA*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrE*, *qnVC* y *aac*. Además, mediante secuenciación de los amplicones de *qnrB* de 4 animales (aislamientos 6.2, 9.5, 10.2 y 29.4) se comprobó que pertenecían al tipo *qnrB19* (Tabla 3.11).

Tabla 3.11 Perfiles de resistencia a los antimicrobianos

Aislamiento	Origen	Virotipo	Perfil de resistencia	<i>qnr</i>
3.1	MF	STEC LEE+/	AMP/ GEN/ STR	n/a
3.4	MF	STEC LEE+	AMP/ GEN/ TOB/ STR	n/a
3.19	MF	STEC LEE+/	AMP/ GEN/ STR	n/a
6.2	MF	EPEC	AMP/ NAL/ ENR/ CIP/ STR/ STX	<i>qnrB19</i>
6.4	MF	EPEC	AMP/ NAL/ ENR/ CIP/ STR/ STX	<i>qnrB</i>
9.5	intestino	STEC LEE+	AMP/ NAL/ ENR/ CIP/ STR	<i>qnrB19</i>
10.2	intestino	STEC LEE+	AMP/ AMC/ CMX/ NAL/ ENR/ CIP/ STR	<i>qnrB19</i>
10.4	pulmón	STEC LEE+	AMP/ NAL/ ENR/ CIP	n/ d
10.6	LNM	STEC LEE+	AMP/ CXM/ NAL/ ENR/ CIP/ STR	<i>qnrB</i>
11.2	MF	STEC LEE+	AMP/ AMC/ CMX/ NAL/ ENR/ CIP/ STR	n/d
12.1	MF	NTEC LEE+	AMP/ NAL/ ENR/ CIP/ STR	<i>qnrB</i>
15.1	MF	STEC LEE+	AMP/ CRO/ NAL/ CIP/ STR	n/d
15.3	MF	STEC LEE+	AMP/ AMC/ NAL/ ENR/ CIP/ GEN/ TOB/ STR/ STX	<i>qnrB</i>
15.11	cerebro	STEC LEE+	AMP/ NAL/ CIP/ STR	<i>qnrB</i>
15.13	cerebro	STEC LEE+	AMP/ NAL/ ENR/ CIP/ GEN/ TOB/ STR	<i>qnrB</i>
15.15	cerebro	STEC LEE+	AMP/ NAL/ ENR/ CIP/ GEN/ TOB/ STR	n/d
15.31	hígado	STEC LEE+	AMP/ NAL/ CIP/ STR	n/d
15.40	pulmón	STEC LEE+	AMP/ NAL/ CIP/ STR	<i>qnrB</i>
15.42	pulmón	STEC LEE-	AMP/ NAL/ ENR/ CIP/ STR/ STX	n/d
16.9	MF	STEC LEE+	AMP/ NAL/ ENR/ CIP/ STR/ STX	<i>qnrB</i>
23.10	MF	NTEC	STR	n/a
29.1	MF	STEC LEE+	AMP/ NAL/ ENR/ CIP/ STR/ STX	<i>qnrB</i>
29.4	MF	EPEC	NAL/ ENR/ CIP/ STR/ STX	<i>qnrB19</i>
31.1	MF	NTEC	AMP/ CIP	n/d
32.1	MF	EPEC	AMP/ CIP/ STR	<i>qnrB</i>

AMP: ampicilina, AMC: amoxicilina-ácido clavulánico, CXM: cefuroxima, NAL: ácido nalidíxico, ENR: enrofloxacina, CIP: ciprofloxacina, GEN: gentamicina, TOB: tobramicina, STR: estreptomycin y SXT: trimetoprim sulfametoxazol. MF: materia fecal, LNM: linfonodo mesentérico; n/a: no aplica; n/d: no determinado para los genes testeados

3.4.6 Tipificación molecular mediante PFGE

Para estimar la diversidad intraespecífica de la selección de aislamientos ($n = 25$), se procedió al análisis de los perfiles de restricción generados obtenidos con endonucleasa y visualizados en los geles de agarosa. Tal como se describe en el capítulo metodológico, para este análisis se utilizó el programa GelCompar II (Applied Maths).

El número de bandas obtenidas por digestión con la enzima *XbaI* estuvo entre 15 y 22 y sus tamaños moleculares se ubicaron entre los 20 y 600 kb (Figura 3.13). Aquellas bandas que quedaron debajo de 20,5 kb, no se consideraron para este estudio. El aislamiento 10.4, perteneciente a pulmón del animal 10, resultó no tipificable por PFGE.

Los 24 aislamientos tipificados, se clasificaron en 17 aislamientos únicos agrupados en 10 variantes genéticas, de las cuales 4 estuvieron integradas por tan solo 1 aislamiento. El resto de las variantes genéticas se integraron por hasta 3 aislamientos únicos. En una misma variante se reconocieron *E. coli* asignadas a diferentes virotipos y recuperadas de distinta muestra biológica, animal y departamento (Tabla 3.12 y Figura 3.13).

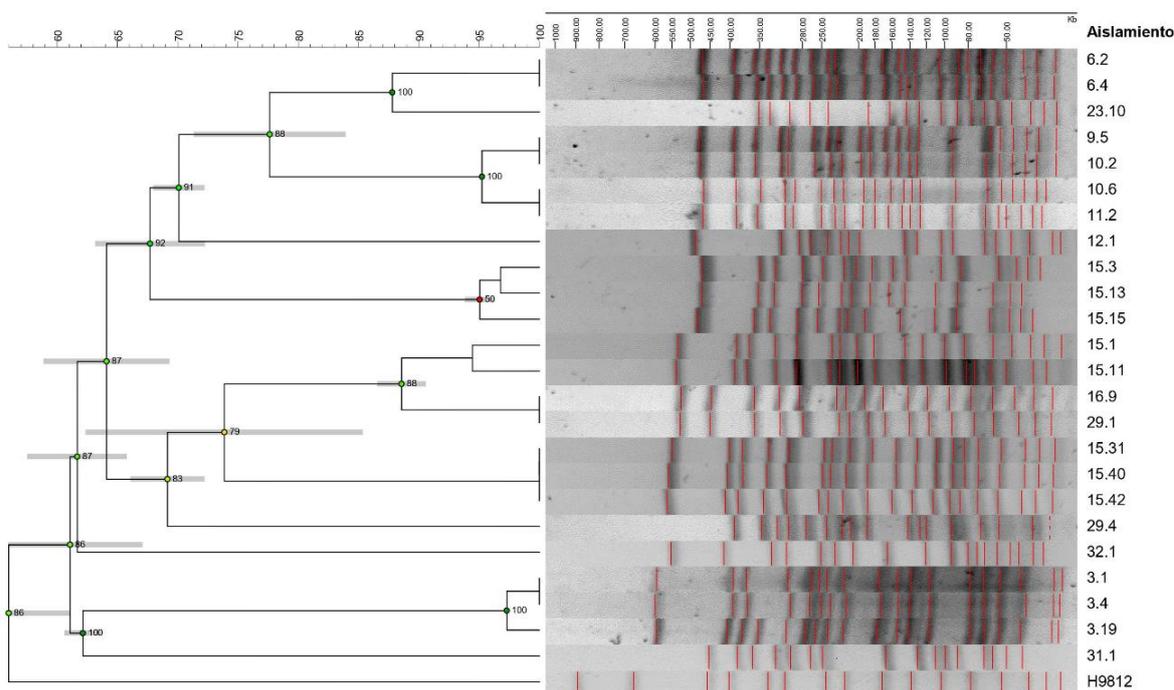


Figura 3.13 Dendrograma generado con los perfiles de bandas obtenidos por PFGE

Dendrograma realizado con el programa GelCompar II (Applied Maths, Versión 6.5), método UPGMA, coeficiente Dice, optimización del 1 % y tolerancia del 1 %. H9812: estándar de referencia *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Braenderup.

Tabla 3.12 Variantes genéticas identificadas mediante PFGE

Variante	Aislamiento	Origen	Departamento	Virotipo
1	3.1 ¹			STEC LEE+/ NTEC
	3.4 ¹	MF	Colonia	STEC
	3.19			STEC LEE+/ NTEC
2	6.2 ²		Río Negro	EPEC
	6.4 ²	MF		
	23.10		Colonia	NTEC
3	9.5 ³	intestino		
	10.2 ³	intestino		
	10.6 ⁴	LNM	San José	STEC LEE+
	11.2 ⁴	MF		
4	12.1	MF	Colonia	NTEC
5	15.3	MF		
	15.13	cerebro	Colonia	STEC LEE+
	15.15			
6	15.1	MF		
	15.11	cerebro		
	16.9 ⁵	MF	Colonia	STEC LEE+
	29.1 ⁵	MF		
7	15.31 ⁶	hígado		
	15.40 ⁶		Colonia	STEC LEE+
	15.42 ⁶	pulmón		
8	29.4	MF	Colonia	EPEC
9	31.1	MF	Colonia	NTEC
10	32.1	MF	Colonia	EPEC

(*) Los números en superíndice indican los clones que integraron los aislamientos.

MF: materia fecal; LNM: linfonodo mesentérico.

Asimismo, 13 perfiles de restricción se alinearon en 6 grupos de clones, cada uno con aislamientos de idéntico perfil de restricción (coeficiente de similitud de 100 %). En algunos casos los aislamientos se habían recuperado de diferentes animales (aislamientos 9.5 - 10.2 y 10.6 - 11.2) aunque pertenecieron al mismo establecimiento (Tabla 3.12 y Figura 3.13).

La variante 1 agrupó aislamientos intestinales del mismo animal, con diferente virotipo. La variante 2, agrupó aislamientos de origen intestinal de dos animales muertos y uno vivo, con diferente virotipos y que pertenecieron a diferente departamento. La variante 3 se conformó por aislamientos de origen intestinal y extraintestinal de diferentes animales muertos en el mismo establecimiento. La variante 4 se integró por un único aislamiento de origen intestinal de un animal muerto. La 5 incluyó dos aislamientos extraintestinales y uno intestinal de un animal muerto. En la variante 6 se observaron aislamientos de 3 animales diferentes (dos muertos y uno vivo), tres de los aislamientos provenían de origen

intestinal y uno era extraintestinal. Además, en esta variante se identificaron dos aislamientos con similitud del 100 % que pertenecieron al animal muerto y a uno vivo de pertenecientes al establecimiento M (aislamientos 16.9 y 29.1). La variante 7 agrupó aislamientos extraintestinales de un único animal muerto y las variantes 8, 9 y 10 se conformaron por un único aislamiento intestinal de un animal vivo cada una.

Finalmente, el índice H' para el grupo de las STEC, NTEC y EPEC fue 0,58, 0,60 y 0,28 respectivamente (Tabla 3.13). Para toda la colección, el valor H' ascendió a 0,83.

Tabla 3.13 *Diversidad genética en los virotipos*

Viotipo	N.º aislamientos	N.º variantes	H'
STEC	11	4	0,58
NTEC	4	4	0,60
EPEC	3	2	0,28

H' : índice de Shannon.

4 Discusión

En Uruguay existe una alta tasa de mortalidad de terneros en producción, la cual se asocia con enfermedades de origen infectocontagioso (Schild 2017). Para abordar un tratamiento adecuado de las infecciones del ganado y planificar estrategias de prevención y control a largo plazo, es esencial identificar los patógenos asociados y sus características de virulencia y resistencia a los antibióticos.

E. coli coloniza el intestino de animales pocas horas después del nacimiento, a partir de la microbiota materna y ambiental, y forma parte de la microbiota normal del tracto digestivo de los animales de sangre caliente, incluidos los bovinos (Gyles y Fairbrother, 2010). Si bien la mayoría de las cepas se encuentran en relación de comensalismo, *E. coli* ha sido ampliamente identificada como responsable de septicemia y mortalidad neonatal en terneros (Gilles Fecteau, Smith y George 2009; Gyles y Fairbrother 2010; Kolenda, Burdukiewicz y Schierack 2015; Peek et al. 2018).

El objetivo de esta tesis fue caracterizar los perfiles genéticos de virulencia de aislamientos intestinales y extraintestinales de *E. coli* de terneros neonatos muertos. Se estudiaron 221 aislamientos asociados a 17 animales muertos y 107 aislamientos recuperados de 15 terneros que convivían con los terneros muertos. Todos los aislamientos se recuperaron entre los años 2015 y 2017 en establecimientos ubicados en Colonia, Río Negro, San José y Canelones. Se evaluó la presencia de 21 genes de virulencia característicos de los serotipos ETEC, STEC, EPEC y NTEC, incluyendo genes codificantes para adhesinas, toxinas y aerobactina de *E. coli* comensales y patógenas intestinales y extraintestinales.

En particular, a través de la técnica de PCR a tiempo final, se evaluó la presencia de secuencias génicas parciales codificantes para las fimbrias F5, F17, F41 y fimbria S, la adhesina no fimbrial CS31A, el pili asociado a pielonefritis Pap, la adhesina Afa, la intimina, las toxinas Shiga Stx1 y Stx2, las toxinas termolábil y termoestable Lt y Sta, las toxinas CdtIII y CdtIV, los factores Cnf1 y Cnf2 y el sideróforo aerobactina.

Las cepas de *E. coli* se caracterizan por poseer una variabilidad genética, que les permite colonizar el intestino de un amplio grupo de vertebrados sin causar enfermedad. No obstante, en ocasiones, pueden convertirse en patógenas, causar infección a nivel

intestinal y/o extraintestinal, y desencadenar la muerte del hospedero (Kaper, Nataro, y Mobley 2004; Köhler y Dobrindt 2011; Batt 2014). Los diferentes caminos que puede tomar *E. coli* para relacionarse con su huésped, se le han atribuido frecuentemente a la adquisición o pérdida de atributos de virulencia, que le confieren una adaptación diferencial en los distintos nichos (Kaper, Nataro y Mobley 2004; Tenaillon et al. 2010; Peek et al. 2018; Robins-Browne et al. 2016).

Estas diferencias en los genes de *E. coli*, están ligadas a la región geográfica en cuestión y a otros factores como la edad, la estación del año y la dieta (Souza et al., 1999; Caprioli et al. 2005; Badouei et al. 2010). Por lo tanto, la caracterización de los genes de virulencia de *E. coli* intestinales y extraintestinales de los animales muertos en nuestro país, es una forma de comprender la causa de su muerte. Sin perjuicio de lo anterior, para realizar un abordaje más amplio, sería necesario considerar otros factores de riesgo asociados a la mortalidad de los terneros, como la presencia de otros agentes o el estado sanitario de los animales, las condiciones de limpieza de los rodeos, el manejo por parte del personal de los establecimientos y las condiciones ambientales, que excedían el objetivo de este trabajo (Marcé et al. 2010; Lorenz et al. 2011).

Los aislamientos estudiados exhibieron una gran variedad de perfiles genéticos de virulencia, la cual se observó tanto a nivel del huésped como de una misma muestra biológica. En adición, se evidenció que a medida que aumentaba el número de muestras biológicas de los animales muertos, aumentaba el número de genes detectados y su diversidad. Estos resultados no son sorprendentes, ya que cada paso de la infección puede estar mediado por una serie de FV alternativos y cada cepa podría tener grandes diferencias en cuanto a su contenido de genes y, al mismo tiempo, dirigirse a los mismos tejidos del huésped y causar la misma enfermedad (Köhler y Dobrindt 2011). Como ya se ha mencionado, los FV pueden estar contenidos en diversos elementos genéticos, como plásmidos, fagos y elementos transponibles, lo que también contribuye a explicar la diversidad de perfiles encontrada (Köhler y Dobrindt 2011).

En el 47 % de los animales muertos ($n = 8$, con aislamientos intestinales y/o extraintestinales) se identificaron *E. coli* con genes característicos de STEC, EPEC y NTEC. Algunos de los aislamientos, presentaron características de los virotipos STEC y NTEC simultáneamente, hecho que resalta la capacidad de estos genes de transferirse

entre las *E. coli*. Los virotipos detectados, ya habían sido identificados en terneros sanos y con diarrea en Uruguay (Umpiérrez 2016; Umpiérrez et al. 2020).

Por otra parte, también el 47 % de los animales muertos ($n = 8$) tuvo aislamientos que fueron negativos para todos los genes evaluados. Más aun, la totalidad de los aislamientos extraintestinales de dos animales muertos no amplificaron ninguno de los genes estudiados. Algunos de estos aislamientos podrían ser comensales o patógenos con combinaciones de genes que promuevan la adhesión, colonización y supervivencia de *E. coli*, y que no fueron evaluados en este trabajo estén presentes en la colección. Esta situación deja abierta la posibilidad de evaluar la presencia de nuevos genes involucrados en diferentes mecanismos de captación de hierro, síntesis de adhesinas o toxinas, entre otros.

En concordancia con la clasificación de los aislamientos ExPEC definida previamente por Johnson y colaboradores (2003), las *E. coli* recuperadas del ambiente extraintestinal de todos los animales presentaron 2 o más genes característicos del grupo. Sin embargo, la proporción de aislamientos con genes característicos de ExPEC fue mayor en *E. coli* recuperadas del ambiente intestinal que del extraintestinal, lo que sugiere un alto potencial de los aislamientos intestinales para causar infecciones a nivel extraintestinal.

Como se expuso en el marco teórico, muchos de los factores considerados de virulencia de ExPEC, también promueven la supervivencia y colonización intestinal, y pueden contribuir a la relación de comensalismo (Clermont et al. 2017; Johnson y Russo 2018). Por lo tanto, es posible que muchos de los aislamientos intestinales incluidos en este trabajo, se encontraran en dicha relación, tanto como causando infección intestinal. Por último, no se puede descartar la posibilidad de que los aislamientos recuperados de MF y contenido intestinal hayan sido transitorios. Una aproximación más acertada para definir o caracterizar los diferentes grupos requeriría el estudio de varios niveles de organización y complejidad del genoma, lo cual excedía los objetivos de este trabajo. Desde el estudio de la secuencia de ADN subgénico, la identificación de genes, operones y PAIs, plásmidos y genomas completos, hasta clones, grupos clonales y grupos filogenéticos son importantes e informativos, y cada uno requiere diferentes métodos de estudio (Johnson y Russo 2018).

Tal como se describió en el capítulo de marco teórico, se ha descrito la ausencia de receptores para Stx en el endotelio del intestino bovino, lo que ha llevado a suponer que el ganado es intrínsecamente resistente a estas toxinas (Pruimboom-Brees et al. 2000). Sin embargo, otros trabajos han proporcionado evidencia sustancial de la existencia de otros tipos de células diana para Stx en los bovinos (Menge 2020). Por ejemplo, se ha confirmado la presencia de isoformas del receptor Gb3 en el epitelio intestinal y el riñón bovinos, así como la unión de Stx a las células epiteliales del intestino delgado y grueso, a las células linfoides submucosas y a células del riñón. La falta de receptores en vasos sanguíneos y en los glomérulos renales de los bovinos, tanto como la variedad de isoformas y niveles de expresión de Gb3, podrían explicar las diferencias clínicas observadas entre los humanos y los bovinos (Hoey et al. 2002).

Además de la citotoxicidad, Stx posee varias funciones que pueden afectar la interacción huésped-bacteria. En contraposición a la citotoxicidad observada en humanos, en los bovinos, las toxinas Stx actuarían principalmente como factores inmunosupresores de virulencia, lo que podría explicar la ausencia de síntomas clínicos durante las infecciones por STEC (Menge 2020). Las Stx afectan directamente la función del sistema inmune, influenciando en la expresión de mediadores de la inflamación y la respuesta inmune innata y adaptativa (Hoey et al. 2002; Stamm et al. 2002). En particular, se ha observado que las toxinas secretadas por STEC de la mucosa intestinal bovina actúan primariamente sobre los linfocitos intraepiteliales y pueden afectar la respuesta inmunitaria del huésped a nivel sistémico (Menge 2020). Luego de la colonización primaria por STEC, la inmunosupresión y la afectación al correcto desarrollo, renovación y desprendimiento de las células epiteliales intestinales, hace que el ganado sea más propenso a la colonización persistente (Hoey et al. 2002; Kieckens et al. 2016).

Es importante considerar que además de los efectos inmunomoduladores de las Stx, otros efectores codificados por aislamientos STEC LEE+ y LEE- pueden participar de los procesos de colonización, inmunodepresión e infección (Kieckens et al. 2016). Como se observa en la Tabla 3.2, además del gen codificante para Stx, los aislamientos STEC tuvieron otros determinantes de virulencia que podrían incluso explicar la capacidad de los aislamientos para alcanzar el ambiente extraintestinal. En efecto, los genes *stx1*, *eae* y *ehxA* se encontraron asociados en los animales (OR = 44; 95% CI, 2,90 - 667,17) (Tabla 3.9, Tabla 7.1 y Tabla 7.2), lo que concuerda con el estudio de Badouei y colaboradores

(2010) en el que también se observó mayor frecuencia del genotipo *stx1*, *eae* y *ehxA*, frente a otras combinaciones de genes en terneros diarreicos en Irán (Badouei et al. 2010). La función principal de la hemolisina se vincula a la capacidad de lisar los glóbulos rojos del huésped y liberar la hemoglobina. Se sabe que los compuestos de hemo son una fuente de hierro para bacterias *in vivo* y se ha verificado que la presencia de hemoglobina libre aumenta notablemente la letalidad de *E. coli* en ratas (Otto, Verweij-Van Vught y Maclaren 1992). Sin duda, la mayor capacidad para captar hierro constituye una ventaja competitiva para las bacterias, en particular en el ambiente extraintestinal e intestinal de los humanos donde las STEC causan diarrea hemorrágica. En los bovinos, que carecen de receptores para las Stx, otros mecanismos podrían provocar hemorragia intestinal, haciendo accesibles los glóbulos rojos a la acción de las hemolisinas de STEC. Por otro lado, se ha demostrado que la proteína de adhesión intimina, fundamental para la inducción de lesiones A/E, posee un rol clave en la colonización de la mucosa y la persistencia de las STEC (Dean-Nystrom et al. 1998; Menge 2020). En adición, otros compuestos también codificados por LEE, promueven la persistencia de STEC LEE+ en ganado vacuno y ovino (Cornick, Booher, y Moon 2002; Van Diemen et al. 2005). Finalmente, sólo un animal muerto tuvo aislamientos positivos al gen *eae*, pero negativos a *stx*, correspondiente al virotipo EPEC. Este virotipo ha sido reportado previamente en nuestro país con una baja proporción en terneros con DNT y en terneros sin síntomas de diarrea (Umpiérrez 2016; Umpiérrez et al. 2020). La coexistencia de genes *exxA* y *eae* y la ausencia de genes *stx* en estos aislamientos podría sugerir la pérdida de este último durante la infección o los subcultivos (Karch et al. 1992; Bielaszewska et al. 2007).

Los resultados de este trabajo determinaron que la ocurrencia de los genes *stx1*, *eae* y *ehxA* fue significativamente más elevada en los terneros muertos a la reportada anteriormente en MF de terneros con diarrea y sin síntomas clínicos en Uruguay (OR = 11,85; IC 95 %, 4,19 - 33,52, OR = 9,75; IC 95 %, 4,05 - 23,49 y OR = 18,02; IC 95 %, 6,65 - 48,84, respectivamente) y Argentina (OR = 18,93; IC 95 %, 5,39 - 66,53, OR = 3,97; IC 95 %, 2,01 - 7,82, respectivamente) (Louge 2016; Umpiérrez et al. 2017; 2020). Como se mencionó anteriormente, estos genes estuvieron más representados en el ambiente intestinal de los animales muertos respecto al ambiente extraintestinal (OR = 8,25; IC 95 %, 1,15 - 59,01, OR = 12,83; IC 95 %, 1,69 - 97,20 y OR = 7,78; IC 95 %, 1,20 - 50,43, respectivamente). Estas observaciones, en conjunto con las realizadas por otros autores, nos llevan a pensar que las *E. coli* intestinales que poseen este conjunto de

genes, podrían debilitar la mucosa intestinal y el sistema inmune, facilitando el desarrollo de enfermedades. Se puede especular entonces, que los animales con dichos aislamientos tendrían un sistema inmune debilitado y que, en conjunto con un mal funcionamiento de la barrera intestinal, estuvieron más propensos a desarrollar una enfermedad y morir. Para confirmar estos hallazgos, sería deseable ampliar el número de animales muestreados o realizar un seguimiento de los animales infectados con STEC y los no infectados. También, sería interesante investigar otros componentes de la microbiota que también podrían estar interactuando negativamente con el huésped (Gomez et al. 2019).

Los genes que codifican para las adhesinas fimbriales P y afimbriales Afa, se detectaron en altas prevalencias en los animales muertos (80 % y 50 %, respectivamente), y no se determinaron diferencias significativas respecto a la prevalencia de estos genes en el ambiente intestinal o extraintestinal. Estos factores, que potencian la habilidad para adaptarse al medio intestinal y competir con otros microorganismos, también promueven la colonización e infección extraintestinal (Leimbach, Hacker y Dobrindt 2013). De la comparación con trabajos anteriores realizados por nuestro grupo de trabajo (Umpiérrez et al. 2020), surge que *papC* y *afa8E* están significativamente más representados en animales muertos que vivos (OR = 2,59; IC 95 %, 1,49 - 4,59, OR = 1,89; IC 95 %, 1,08 - 3,32, respectivamente). La misma observación se realizó al comparar animales de Argentina (OR = 3,31; IC 95 %, 1,85 - 5,93, OR = 7,53; IC 95 %, 3,73 - 15,20, respectivamente) (Louge 2016). Por lo tanto, su presencia podría haber estado relacionada con la muerte de los animales.

Los genes que codifican para la fimbria F17 para la adhesina no fimbrial CS31A, también se detectaron en altas prevalencias entre los animales muertos (70 % y 30 %, respectivamente), y no se encontraron diferencias significativas entre el ambiente intestinal y extraintestinal. Diversos estudios sugieren que estas adhesinas se encuentran entre las más relevantes en el proceso de infección por *E. coli*, estatus que se les atribuye gracias a su rol en las primeras etapas de adhesión y colonización al intestino (Mercado et al. 2003; Nagy y Fekete 2005; Gyles y Fairbrother 2010; Mainil 2013). Algunos trabajos han demostrado una asociación entre la presencia de estas adhesinas y las infecciones por ExPEC (Bertin et al. 1996; Van Bost et al. 2003; Ghanbarpour y Oswald 2010). De comparar la prevalencia de los genes codificantes para F17 y CS31A con otros trabajos de la región, no surgieron diferencias significativas (OR, IC 95 %) (Umpiérrez

2016; Louge 2016; Umpiérrez et al. 2020). La elevada prevalencia de estas adhesinas en *E. coli* asociadas a bovinos, sugiere un rol importante para su adaptación al hospedero, tanto en el ambiente intestinal como extraintestinal. No obstante, hasta ahora no es posible asociarlas a la mortalidad de los animales en Uruguay.

Al igual que en trabajos anteriores, dentro de los perfiles genéticos *f17A+*, se observó mayor prevalencia de genes *f17GII* con respecto a la subfamilia *GI* (Bertin et al. 1996; Bertin 1998; Umpiérrez et al. 2017; 2020). No obstante, la prevalencia global de *f17GII* fue significativamente menor en animales muertos que en terneros vivos de Uruguay (OR = 0,48; IC 95 %, 0,25 - 0,93) (Umpiérrez et al. 2020). Esta diferencia, no se evidenció al analizar los animales con aislamientos intestinales, lo que sugiere que esta subunidad tendría un rol más importante en el intestino. En contraposición, la prevalencia del gen *f17GI* fue significativamente mayor en animales muertos que vivos estudiados previamente en Uruguay, sugiriendo un rol en la mortalidad (OR = 6,70; IC 95 %, 1,93 - 23,20) (Umpiérrez et al. 2020).

El gen con mayor prevalencia entre los animales muertos fue *iucD* (82 %, $n = 14$), el cual también se determinó en 27 de los 37 + 1 perfiles únicos de virulencia. Su prevalencia fue elevada en el entorno intestinal (100 %) como extraintestinal (70 %), lo que indica la importancia de este sideróforo para la supervivencia de *E. coli*. La prevalencia para este gen estuvo en el orden de la reportada previamente en animales vivos con y sin síntomas de diarrea de Uruguay (79,2 % y 84,5 %, respectivamente), aunque fue significativamente mayor a la reportada en animales vivos de tambos en Argentina (OR = 10,73; IC 95 %, 5,50 - 20,93) (Louge 2016; Umpiérrez et al. 2020). Estas observaciones podrían advertir un fuerte componente regional. Se ha sugerido que el sideróforo aerobactina es el más eficaz de los sistemas de quelación del hierro y posee un importante rol en la colonización, tanto para los aislamientos intestinales como extraintestinales (Johnson 1991; Torres et al. 2001). Sin perjuicio de lo anterior, los aislamientos de *E. coli* pueden utilizar otros mecanismos de captación de hierro que no fueron estudiados en este trabajo.

Mediante la evaluación de los perfiles únicos de virulencia se determinó que, muy frecuentemente, *iucD* se detecta en simultáneo con genes codificantes para alguna de las adhesinas testeadas (25 de 27 perfiles *iucD+*) y, con menor frecuencia, con genes codificantes para toxinas y adhesinas (7 de 25 perfiles *iucD+*). Este hecho, ha sido observado también por otros autores (Kaper, Nataro y Mobley 2004; Mainil 2013). La

elevada prevalencia de perfiles genéticos con *iucD* y adhesinas podría indicar mayor habilidad para colonizar y permanecer en los tejidos del huésped. Sin embargo, la sola presencia de este gen no se asoció a mayor riesgo de mortalidad de los animales. La identificación de perfiles genéticos con genes como *iucD*, *afa8E*, *clpG*, *f17* y *papC*, sugiere la habilidad de los aislamientos para sobrellevar exitosamente las primeras etapas de la infección y persistir en el hospedero. Por otro lado, su alta prevalencia tanto a nivel intestinal como extraintestinal apoya observaciones previas que señalan que el intestino podría ser el principal reservorio del grupo ExPEC (Russo y Johnson 2003; Leimbach, Hacker y Dobrindt 2013; Louge 2016; Bok et al. 2020; Manges et al. 2019).

Los genes codificantes para Cnf1 y Cnf2, característicos del virotipo NTEC, se detectaron en muy baja prevalencia y ninguno de ellos se detectó en el ambiente extraintestinal de animales muertos. El gen *cnf2* se detectó solo en un animal muerto y siempre asociado a *iucD*, *f17A*, *f17GII*, *cdtIII* y *cnf1*. Por su parte, el gen *cnf1* se detectó en otro animal muerto, también en aislamientos de MF, pero asociado a los genes *iucD*, *eae*, *ehxA* y *stx*. La circulación de los genes *cnf1* y *cnf2* en bovinos ha sido demostrada previamente en la región para animales sanos y con diarrea al igual que la coexistencia de otros genes codificantes para toxinas, adhesinas y la aerobactina. Al comparar las prevalencias en los animales muertos con animales vivos y con diarrea de otros trabajos de la región, no se observaron diferencias significativas, lo que puede sugerir que el virotipo NTEC no estaría asociado a la mortalidad de los terneros (Louge 2016; Umpiérrez et al. 2020).

Por otro lado, se analizó la presencia de genes característicos del virotipo ETEC (*sta* y *lt*) y las fimbrias comúnmente asociadas a este virotipo (*f5* y *f41*), no detectándose ningún aislamiento positivo. Si bien, este virotipo se ha visto mayormente asociado a aislamientos de bovinos con diarrea, estudios previos realizados en la región han determinado una muy baja prevalencia (< 15 %) entre los aislamientos de bovinos con esta sintomatología (Kolenda, Burdukiewicz y Schierack 2015; Umpiérrez 2016; Louge 2016; Umpiérrez et al. 2020). En las últimas décadas, la presencia de la fimbria *f5* se ha reducido significativamente (Kolenda, Burdukiewicz y Schierack 2015). Es posible que la baja prevalencia se deba al uso de vacunas en las madres gestantes, para prevenir la DNT, las cuales están diseñadas principalmente para evitar infecciones por ETEC (Nagy y Fekete 1999). Los resultados de este trabajo concuerdan con la baja circulación de este virotipo en los rodeos de nuestro país observada previamente por nuestro grupo de trabajo

y sugiere que este virotipo no sería relevante en la mortalidad de los terneros de Uruguay (Umpiérrez 2016; Umpiérrez et al. 2020).

Finalmente, no se detectó en ningún caso la presencia de *stx2* ni *saa*, ambos asociados al virotipo STEC, lo que sugiere una baja circulación de estos genes en los terneros y escasa relevancia en la mortalidad. No obstante, es importante considerar que los genes que codifican para las toxinas Stx se ubican en fagos y pueden escindirse y perderse con los subcultivos en el laboratorio y, por lo tanto, su prevalencia podría estar subestimada (Karch et al. 1992; Bielaszewska et al. 2007). Estos resultados coinciden con los obtenidos previamente en nuestro laboratorio a partir de aislamientos provenientes de terneros con diarrea y sin síntomas clínicos, en donde las prevalencias para estos genes fueron muy bajas (1,6 y 5,2 % respectivamente) (Umpiérrez et al. 2017; 2020). Las Stx2 se asocian a SUH y la infección por estas cepas normalmente se asocia con consecuencias más severas que las Stx1 (Bergan et al. 2012; Gyles 2007). Por otro lado, tampoco se detectó el gen *sfaDE*, que codifica para la fimbria S. A pesar de esto, se ha sugerido que estas fimbrias se encuentran muy extendidas entre los aislados extraintestinales, y de hecho es uno de los marcadores moleculares característicos del grupo (Ott et al. 1986; Russo y Johnson 2003; Johnson y Russo 2018). En nuestro país, se ha reportado su presencia en aislamientos intestinales provenientes de terneros con diarrea y sanos; aunque con baja prevalencia (6,0 y 3,9 %, respectivamente), lo que coincide con los resultados de este estudio (Umpiérrez et al. 2020).

Cabe resaltar que, en este trabajo, no se analizó la presencia de otros patógenos ni se analizaron parámetros para evaluar el estado de salud del animal, por lo tanto, la identificación de *E. coli* y sus factores de virulencia, no debe ser interpretado como la causa de muerte del animal.

En los establecimientos, se detectaron genes de virulencia presentes tanto en los animales muertos y como los vivos (*iucD*, *afa8E*, *clpG*, *f17A* y *papC*). En particular, en alguno de los establecimientos, los genes *iucD*, *afa8E*, *clpG* y *papC* se encontraron más representados en el animal muerto que vivo (OR = 45; IC 95 %, 2,07 - 997,47, OR = 74,77; IC 95 %, 9,13 - 612,28, OR = 66,29; IC 95 %, 3,82 - 1149,61 y OR = 14,52; IC 95 %, 3,78 - 55,80, respectivamente) mientras que *f17A* se determinó en menor prevalencia (OR = 0,26; IC 95 %, 0,07 - 0,98). Además, en los animales muertos de dos de los establecimientos se determinaron genes que no se detectaron en los vivos (*cae*, *f17GI* y

ehxA). Se podría especular que la presencia de esos genes está involucrada con la mortalidad. Aunque los resultados coinciden parcialmente con lo observado al comparar los animales muertos de este trabajo con los vivos estudiados por Umpiérrez y colaboradores (2020), no se pudo determinar una asociación estadísticamente relevante entre la presencia o ausencia de genes en el animal muerto y los animales vivos que convivieron en el mismo establecimiento. Es de esperar que un número mayor de animales muertos en los establecimientos pudiera conducir a similares observaciones a las discutidas en los apartados anteriores.

Al estudiar el grupo de animales vivos, se observó que presentaban el mismo conjunto de genes de virulencia identificados en los animales muertos, los cuales incluyeron los genes característicos de STEC, EPEC y NTEC. Los genes codificantes para Stx1, Eae y EhxA estuvieron significativamente más representados en el ambiente intestinal de los animales muertos que vivos (OR = 8,25; IC 95 %, 1,15 - 59,01, OR = 12,83; IC 95 %, 1,69 - 97,20 y OR = 7,78; IC 95 %, 1,20 - 50,43, respectivamente). Este resultado apoya la idea de que esta combinación de genes en las *E. coli* intestinales puede deteriorar la salud de los animales y, de alguna manera, promover la muerte de los terneros.

En los terneros vivos ($n = 15$) se detectaron hasta 2 genes menos por animal que en los animales muertos ($n = 17$). Es posible que este resultado se deba a que la adaptación al medio extraintestinal requiera de una combinación de genes diferentes, los cuales pueden ser variables en cada etapa de la infección (Köhler y Dobrindt 2011). La diversidad de perfiles genéticos de virulencia detectados, incluso en idénticas muestras biológicas, refleja la elevada plasticidad genética de *E. coli* que brinda una variedad de caminos adaptativos para sobrevivir a un entorno específico (Russo y Johnson 2000; Mokady, Gophna y Ron 2005; Ron 2006; Köhler y Dobrindt 2011)

Al comparar el grupo de animales vivos ($n = 17$, MF) incluidos en este trabajo con todos los animales muertos ($n = 15$, aislamientos intestinales y extraintestinales), se determinó que la prevalencia de los genes *clpG* y *f17GII* en los animales muertos fue significativamente menor a la encontrada en los animales vivos, lo que sugiere un rol más importante en la adaptación al ambiente intestinal (OR = 0,21; IC 95 %, 0,04 - 0,94 y OR = 0,19; IC 95 %, 0,04 - 0,94 respectivamente). Algunos trabajos han asociado la presencia de CS31A y F17 en animales con síntomas de diarrea con mayor frecuencia que en animales sanos (Kolenda, Burdukiewicz y Schierack 2015). Sin embargo, otros las han

asociado epidemiológicamente a cepas ExPEC, al tiempo que no se ha comprobado experimentalmente su contribución a la virulencia (Johnson y Russo 2018). En efecto, trabajos anteriores realizados en nuestro país, han detectado los genes *clpG* y *fl7GII* en altas prevalencias tanto para animales con diarrea como clínicamente sanos (Umpiérrez et al. 2016; 2020).

Posteriormente, se estudió la diversidad intraespecífica de una colección de *E. coli* que incluyó los perfiles únicos de virulencia detectados en cada animal y en cada muestra biológica ($n = 85 - 3$). De esta manera, se pretendió que la muestra fuera lo más representativa de toda la colección. No se logró establecer una relación entre el genotipo de virulencia y las variantes genéticas determinadas por *rep*-PCR, lo que podría deberse a la movilidad de los genes de virulencia estudiados.

Según los índices de Shannon determinados, los aislamientos recuperados de terneros muertos mostraron una menor heterogeneidad ($H' = 1,07$) en relación a la reportada para aislamientos provenientes de MF de animales con diarrea y sin síntomas ($H' = 2,89$) (Umpiérrez 2016). Este resultado podría significar que existe mayor similitud entre los aislamientos asociados a mortalidad. En este estudio, se determinó que representantes de ciertas variantes genéticas estaban presentes en diferentes muestras, animales y departamentos. Este hecho sugiere que podría haber variantes con más éxito para diseminarse y adaptarse al nuevo hospedero. Adicionalmente, podría considerarse la posibilidad de que estas variantes tengan una mayor potencialidad para causar la muerte de los terneros, aunque, como se discutió previamente, otros agentes etiológicos, el estado de salud del animal tanto como factores ambientales de manejo pueden haber influido en el deceso de los terneros (Marcé et al. 2010; Lorenz et al. 2011).

Como ya fue mencionado, entre los aspectos de riesgo de mayor severidad de la infección por STEC, se destaca la presencia de la adhesina intimina, la cual puede tener un efecto sinérgico junto a las Stx. Otro aspecto relevante que puede determinar la severidad de la infección, es el nivel de expresión de estos genes, no evaluado en este trabajo (Fuller et al. 2011; Gyles 2007). No menos importante, son los subtipos de Stx, que poseen un papel fundamental en el aspecto de la severidad de la infección. De esta manera, ciertos subtipos se vinculan a alta potencia de la toxina y a la severidad de la infección, mientras que otros a baja potencia y severidad. Por ejemplo, todos los subtipos de Stx1 y los subtipos Stx2b, Stx2e, Stx2f y Stx2g de Stx2e se vinculan mayoritariamente a baja toxicidad en seres

humanos. El resto de los subtipos de Stx2 (Stx2a, Stx2c y Stx2d) poseen elevados niveles de toxicidad y se asocian a CH y SUH (Akiyama et al. 2017). Más aun, podría existir una relación sinérgica o antagónica entre los diferentes subtipos (Fuller et al. 2011). En lo que refiere a este virotipo, se analizó una colección de 18 aislamientos en los que se detectó un perfil único *stx+*, según su aislamiento de una única muestra biológica. Los aislamientos fueron todos *stxI+* y pertenecieron a 7 animales, 6 muertos y uno vivo. Todos los aislamientos, a excepción de uno, fueron positivos para *stxIa* y *stxIc*. Nuestros resultados confirman la circulación de estos dos subtipos en los rodeos de nuestro país, en particular en los terneros muertos. Un muestreo más exhaustivo sería necesario para establecer prevalencias tanto como la presencia de otros subtipos circulantes. La prevalencia de los genes *stxIa* y *stxIc* en simultáneo, ha sido reportada previamente en bovinos de Uruguay; sin embargo, también se han identificado aislamientos únicamente positivos al subtipo *stxIa* (Ernst 2017; Umpiérrez et al. 2020b en revisión). En otras regiones como Japón, Irán o Estados Unidos, el subtipo Stx1a se ha identificado con mayor frecuencia que Stx1c y d (Akiyama et al. 2017; Jajarmi et al. 2017; Shridhar et al. 2017).

Mediante la metodología propuesta por Clermont y colaboradores (2013), se evaluó la asignación de grupo filogenético de los 25 aislamientos seleccionados, pertenecientes a los virotipos STEC, NTEC y EPEC, y al híbrido NTEC/STEC. La mayoría de los aislamientos, se asignaron al grupo B1, y en menor proporción se detectaron los filogrupos A, C y E.

Se ha sugerido que los aislamientos de *E. coli* de diferentes orígenes generalmente pertenecen a diferentes filogrupos (Clermont et al. 2013). Los 7 aislamientos recuperados del ambiente extraintestinal agruparon en los filogrupos B1 y C. Paradójicamente, las cepas ExPEC se han asignado principalmente al grupo B2 y en menor medida a los grupos D, C y F, mientras que las cepas de *E. coli* comensales y diarreogénicas se han asignado principalmente a los grupos A, B1 y E (Picard et al. 1999; Tenailon et al. 2010; Denamur et al. 2020). La falta de concordancia entre nuestras observaciones y la literatura podría explicarse por el surgimiento de nuevos grupos con genes y características de ExPEC y la capacidad de cepas intestinales para causar infecciones extraintestinales. Similarmente, todos los aislamientos categorizados como NTEC (con excepción de los híbridos) también agruparon en el filogrupo B1. Los aislamientos STEC se asignaron

mayoritariamente al grupo B1, luego al E, pero también al C y al A. En particular, los aislamientos que agruparon en estos últimos correspondieron a uno de origen extraintestinal y otros dos eran híbridos (NTEC/STEC). Finalmente, los 4 aislamientos de EPEC incluidos en el estudio agruparon en el filogrupo E. Nuestros resultados coinciden sólo parcialmente con la literatura donde las cepas del virotipo STEC se asigna a los filogrupos B1 y E y las EPEC al E (Denamur et al. 2020). En Uruguay, la heterogeneidad en la asignación de grupo filogenético observada entre las STEC fue advertida previamente en aislamientos recuperados de heces de bovinos. En aquel estudio se determinó el grupo F, el cual no fue detectado en este trabajo (Cardozo 2020).

Al igual que las cepas de *E. coli* humanas, las cepas bovinas pertenecen a un número creciente de serogrupos, muchos de los cuales también se asocian a enfermedad en el humano. A pesar de esto, O157: H7 EHEC se ha asociado excepcionalmente con diarrea en terneros jóvenes (Mainil y Daube 2005). En este trabajo 9 aislamientos STEC asociados a mortalidad se asignaron al serogrupo O111 mientras que, entre los animales vivos, 1 STEC se asignó al O111 y 2 EPEC al O26. Los resultados coinciden parcialmente con los informados previamente en Uruguay para aislamientos de bovinos (Cardozo 2020). En aquel estudio se detectaron los serogrupos O103 y O111, y no se detectó el serogrupo O26. No obstante, al igual que en este trabajo, una cantidad considerable de aislamientos no pudieron ser asignados a ninguno de los 7 serogrupos testeados. El elevado número de cepas no tipificables a ninguno de los serogrupos testeados sugiere la circulación de otros serogrupos diferentes a O157:H7 y los serogrupos conocidos como “*big six*” (O26, O45, O103, O111, O121 y O145). Aunque los brotes epidémicos con *E. coli* no O157 son menos frecuentes, en algunos países, los serogrupos O26, O103, O104, O111 y O145, son frecuentemente identificados como responsables de CH y SUH (Mainil y Daube 2005; Rivas et al. 2006; Prevention n.d.; Johnson 1991; Smith, Fratamico y Gunther 2014). En particular, en Uruguay los serogrupos O111, O26 y O145 han sido identificados tanto en humanos como en alimentos, y en particular O26 se ha asociado a animales sacrificados para el consumo (canales) en la región (Varela et al. 2008; Cap et al. 2019). Estas observaciones reafirman el potencial zoonótico de los aislamientos estudiados en este trabajo

A la selección de aislamientos STEC, NTEC y EPEC ($n = 25$) se le evaluó los perfiles de resistencia a los antimicrobianos. En total, se testearon 14 antibióticos con el método de

disco difusión en agar. Los 17 animales muertos tuvieron aislamientos multirresistentes, es decir que exhibieron resistencia a al menos 3 clases diferentes de antimicrobianos. De la misma manera, en 3 de los 4 animales vivos también se identificaron aislamientos multirresistentes.

La resistencia a los antimicrobianos desafía la eficacia de los medicamentos en la prevención y el tratamiento de las infecciones, lo que aumenta la duración de la enfermedad, el riesgo de transmisión a otros huéspedes y muerte (World Health Organization (WHO) 2017). El uso y abuso de los antimicrobianos se asocia la selección de mecanismos de resistencia y aparición de multirresistencias (Bosman et al. 2014; WHO 2017). En los aislamientos seleccionados ($n = 25$) se observó un patrón común de resistencia a AMP, STR y alguna de las quinolonas testeadas (ENR, CIP y NAL), la cual estuvo presente en 9 de 12 animales incluidos en el estudio (7 muertos y 2 vivos) pertenecientes a 3 de los 4 departamentos estudiados. Este resultado podría reflejar el uso extensivo de estos antimicrobianos en ganadería. Además, dado que los genes que confieren resistencia pueden estar ligados entre sí en elementos genéticos móviles, la co-selección de la resistencia podría ser también un factor importante en el fenotipo observado (European Food Safety Authority (EFSA) 2017).

En concordancia con nuestros resultados, la resistencia de STEC a los antibióticos ha sido demostrada a nivel global (Mir y Kudva 2019). Similarmente a lo observado en este trabajo, un estudio realizado en Uruguay con aislamientos recuperados de terneros vivos durante los años 2014 a 2017, señala a la ampicilina como la más prevalente de las resistencias entre las STEC (Cardozo 2020). El alto porcentaje de resistencia a AMP concuerda con el hecho de que los β -lactámicos son los antibióticos más utilizados en animales (Marshall y Levy 2011). Sin embargo, en aquel estudio no se determinaron multirresistencias (Cardozo 2020). Este resultado podría deberse a que los animales antes de morir recibieron mayores dosis de antimicrobianos que aquellos que no presentaban signos de enfermedad o tenían diarrea incluidos en el trabajo de Umpiérrez y colaboradores (2020). Por otro lado, se puede hipotetizar que existe una tendencia al aumento de la resistencia observada en la escala temporal se deba al incremento del uso de antimicrobianos en los rodeos. En efecto, trabajos anteriores realizados en nuestro país han determinado menores niveles de resistencias (Umpiérrez 2016; Umpiérrez et al. 2017; Coppola et al. 2020).

Los elementos genéticos móviles, como los plásmidos con genes de resistencia a antibióticos codificados por transposones e integrones, desempeñan un papel importante en la THG. Dicha transferencia se ha observado tanto entre bacterias estrechamente relacionadas como filogenéticamente distantes, lo que sugiere una amplia gama de huéspedes para los plásmidos (Mir y Kudva 2019). La resistencia de *E. coli* a las quinolonas está muy extendida a nivel mundial y el surgimiento de nuevos mecanismos de resistencia transferibles es preocupante (WHO) 2017; Advisory Group on Integrated Surveillance of Antimicrobial Resistance (AGISAR) 2018). Para determinar los mecanismos de resistencia circulantes y transferibles, todos los aislamientos resistentes fueron analizados para testear la presencia e identificación de genes plasmídicos *qnr*. Se detectó la presencia del tipo *qnrB* en aislamientos recuperados de 8 de los 10 animales testeados. En particular, en 4 de los animales, se detectó la circulación del gen *qnrB19*. Esta variante genética ha sido previamente identificada en aislamientos de pollos, cerdos, bovinos y humanos de nuestro país (Umpiérrez 2017; Bado 2017; Cóppola et al. 2020). Si bien se acepta que estos determinantes no confieren un alto nivel de resistencia, pueden potenciar otros mecanismos y diseminarse fácilmente (Rodríguez-Martínez et al. 2016).

A pesar de que la proporción de cepas multirresistentes puede variar de una región a otra, es un problema complejo, que afecta tanto a los humanos como a los animales y depende de múltiples factores interrelacionados. Para minimizar la aparición y propagación de las resistencias es crucial que todos los países tomen acciones coordinadas, algunas de las cuales incluyen la inversión en investigación y desarrollo de nuevas drogas antimicrobianas, vacunas y pruebas diagnósticas (WHO 2017). En el diseño de estrategias que minimicen o reduzcan la diseminación de *E. coli* resistente, la contaminación de los alimentos, las infecciones humanas y la propagación ambiental de genes de resistencia, se deben considerar las condiciones de manejo en todos los niveles.

Mediante la técnica de PFGE, se estudió la diversidad intraespecífica de la selección de 25 aislamientos EPEC, STEC y NTEC, los cuales se agruparon en 17 aislamientos únicos. En líneas generales, los aislamientos de un mismo animal presentaron patrones más similares en comparación con los de otros animales y no se observó mayor similitud entre los aislamientos intestinales ni entre los aislamientos extraintestinales. En particular, se observó que aislamientos STEC intestinales y extraintestinales de un mismo animal, agruparon en una misma variante, independientemente del origen. Este resultado sugiere

que las STEC intestinales pudieron alcanzar el ambiente extraintestinal y que el uso de esta técnica no es suficiente para diferenciar entre estos dos grupos. Al igual que lo observado con la técnica de *rep*-PCR, el índice de Shannon calculado a partir de los perfiles de PFGE indicó una diversidad baja para toda la colección ($H' = 0,83$); más baja aún, cuando se analizó la diversidad de los virotipos STEC, EPEC y NTEC ($H' = 0,58$, $H' = 0,60$ y $H' = 0,28$ respectivamente). Sin embargo, el bajo número de muestras utilizado para este análisis es una gran limitación a la hora de su interpretación.

Todos los clones se conformaron con aislamientos que presentaron diferentes perfiles de virulencia y de resistencia a los antimicrobianos. Esta observación remarca una vez más la movilidad de los genes que los codifican. Por otro lado, todos los clones compartieron el mismo grupo filogenético y serogrupo, aunque sí se observaron diferentes filogrupos dentro de una misma variante (E y B1, B1 y C). Se ha propuesto que la utilidad de esta técnica podría ser mayor en el estudio de brotes epidemiológicos en espacios limitados y, por lo tanto, podría ser más adecuada para el estudio de aislamientos pertenecientes a un mismo establecimiento (Bae et al. 2014).

5 Conclusiones

Este estudio fue el primer trabajo en Uruguay orientado a caracterizar aislamientos de *E. coli* provenientes de terneros muertos en diferentes tambos del país. Además, se estudiaron animales vivos en 3 establecimientos con casos de mortalidad.

En los terneros muertos, tanto en el ambiente intestinal como extraintestinal, los resultados evidenciaron altas prevalencias de genes codificantes para adhesinas (Afa, F17A y PapC) y el sideróforo aerobactina. Este resultado reafirma la importancia de los mecanismos de adhesión y la captación de hierro para la supervivencia de *E. coli* en el hospedero.

Por otro lado, la prevalencia de los genes codificantes para Stx1, EhxA y Eae fue significativamente mayor en el ambiente intestinal respecto al ambiente extraintestinal de los animales muertos (OR = 8,25; IC 95 %, 1,15 - 59,01; OR = 12,83; IC 95 %, 1,69 - 97,20 y OR = 7,78; IC 95 %, 1,20 - 50,43, respectivamente) y al intestinal de los animales vivos de los 3 establecimientos estudiados (OR = 21; IC 95 %, 1,92 - 229,40; OR = 15,17; IC 95 %, 2,03 - 113,35 y OR = 15,17; IC 95 %, 2,03 - 113,35, respectivamente). Se sabe que estos genes potencian la habilidad de *E. coli* para permanecer en el intestino, dañan la membrana alterando su normal funcionamiento y provocan la supresión de la respuesta inmune. Por lo tanto, se puede especular que la detección de estos genes en la MF de los terneros, podría ser un indicador de mayor riesgo para la mortalidad, aunque más estudios son necesarios para confirmarlo.

En contraposición, los genes codificantes para las adhesinas F17GII y ClpG, estuvieron menos representadas en el intestino de los animales muertos respecto a los animales vivos de los 3 establecimientos estudiados (OR = 0,21; IC 95 %, 0,04 - 0,94 y OR = 0,19; IC 95 %, 0,04 - 0,94 respectivamente), lo que sugiere que dichos genes podrían tener un rol más importante en el ambiente intestinal de los terneros.

En concordancia con estudios anteriores realizados en nuestro país, los genes codificantes para las toxinas Cdt, Cnf y Stx2, las enterotoxinas Lt, Sta, y las adhesinas F5, F41 y Sfa se identificaron en baja o nula prevalencia.

Tanto los aislamientos de animales muertos como vivos se categorizaron en virotipos EPEC, NTEC y STEC. Considerando que los genes de virulencia son independientes del huésped, los resultados sugieren un alto grado de riesgo zoonótico.

En particular, los genes *stx1*, *eae* y *ehxA* se encontraron positivamente asociados entre sí (OR = 44; 95% CI, 2,90 - 667,17). Este hecho podría ser relevante a la hora de diseñar una estrategia de control para las STEC, extensamente conocidas por causar CH y SUH en humanos.

Finalmente, se comparó la prevalencia de los genes en los animales muertos (aislamientos intestinales y/o extraintestinales) con la prevalencia en animales vivos reportada previamente para ambos del Uruguay (Umpiérrez et al. 2020). De esta comparación se pudo concluir que los genes codificantes para las adhesinas Afa8E, Eae, PapC, la subunidad F17GI y las toxinas EhxA y Stx1, están significativamente más representados en terneros muertos de nuestro país que en los vivos (OR = 9,75; IC 95 %, 4,05 - 23,49; OR = 2,59; IC 95 %, 1,49 - 4,59; OR = 1,89; IC 95 %, 1,08 - 3,32; OR = 6,70; IC 95 %, 1,93 - 23,20; OR = 11,85; IC 95 %, 4,19 - 33,52 y OR = 18,02; IC 95 %, 6,65 - 48,84, respectivamente), mientras que f17GII se encuentra en menor prevalencia (OR = 0,48; IC 95 %, 0,25 - 0,93) (Umpiérrez et al. 2020). Los resultados sugieren que los aislamientos de *E. coli* asociados a mortalidad de terneros en Uruguay presentan características de virulencia diferentes a los asociados a terneros vivos y que las toxinas Stx, EhxA y la adhesina Eae podrían ser un factor de riesgo para la mortalidad.

Mediante la técnica de *rep*-PCR, la colección de aislamientos con perfiles únicos de virulencia de *E. coli* recuperadas de animales muertos mostró una baja diversidad intraespecífica entre las cepas circulantes. Por otro lado, el análisis de PFGE de los aislamientos seleccionados exhibió un mayor grado de discriminación según el animal al que pertenecían. No obstante, ninguna de las técnicas evidenció una relación clara entre la agrupación de los aislamientos y los perfiles genéticos de virulencia. Por lo tanto, es esperable que puedan contribuir a estudios epidemiológicos, pero que no sean tan útiles para inferir perfiles de virulencia.

De la misma manera, los aislamientos con virotipos STEC, EPEC y NTEC seleccionados ($n = 25$) se asignaron a diversos grupos filogenéticos (A, B1, C y E) y no se observó alguna relación entre el filogrupo y el virotipo ni entre el filogrupo y el origen intestinal

o extraintestinal. Por lo tanto, el estudio del filogrupo no sería adecuado para asociar el perfil genético de virulencia ni la fuente de origen intestinal o extraintestinal.

Los serogrupos O111 y O26, identificados en la selección de aislamientos ($n = 25$) han sido detectados en alimentos y humanos en nuestro país, lo que destaca el riesgo zoonótico. No obstante, la mayoría de los aislamientos seleccionados no pudieron ser asignados ni a O157 ni a los “*big six*”, por lo que se puede sospechar la existencia de otros serogrupos circulantes.

Todos los aislamientos seleccionados ($n = 25$) presentaron resistencia a al menos uno de los antibióticos testeados. De los 12 animales (8 muertos y 4 vivos) incluidos en este estudio, 10 (8 muertos y 2 vivos) presentaron aislamientos multirresistentes, es decir que exhibieron resistencia a al menos 3 clases de antibióticos. En particular, en la colección se determinó una prevalencia de resistencia mayor al 60 % para los antibióticos AMP, STR, CIP, NAL y ENR, mientras que la prevalencia de resistencia a GEN, SXT, TOB, AMC y CXM fue menor al 25 %. Adicionalmente, en 8 de 10 animales con resistencia a quinolonas, se detectó el gen plasmídico *qnrB* y, en particular la variante *qnrB19*, lo que destaca el potencial de *E. coli* de origen bovino como reservorio de genes transferibles de resistencia para quinolonas. Por otro lado, todos los aislamientos fueron sensibles a CAZ, CRO, FEP y AK y no se detectaron BLEE.

Trabajos realizados en Uruguay años atrás, han determinado menores niveles de resistencia a los antimicrobianos en MF de terneros vivos (Umpiérrez et al. 2017; Coppola et al. 2020). El aumento en la resistencia de *E. coli* bovina observada a través de los años en nuestro país podría deberse al mayor uso de los antibióticos en la ganadería. Es necesario hacer hincapié en un adecuado uso de los antibióticos y el desarrollo de alternativas para dar tratamiento a las infecciones, de manera de minimizar la diseminación de *E. coli* resistente a otros huéspedes y al ambiente.

6 Perspectivas

La colonización de los bovinos por STEC es una amenaza la salud pública y de los animales. Por lo tanto, es imperioso el desarrollo de estrategias de prevención y control que permitan disminuir la colonización de los terneros por STEC. Para ello se podría evaluar compuestos vacunales contra este patógeno. El éxito de los intentos de vacunar al ganado se ha limitado principalmente a cepas las STEC LEE+, con proteínas codificadas por LEE como blanco de la inmunización (Eae, Tir, entre otras) y a cepas que codifican para la flagelina H7. Considerando que todos los animales colonizados por STEC tuvieron aislamientos positivos al gen *eae*, esta proteína podría ser utilizada como antígeno en una estrategia de inmunidad adquirida. En este sentido, sería interesante identificar las variantes de intimina circulantes en nuestro país. Sin embargo, una estrategia de mayor alcance para prevenir las infecciones por STEC en bovinos y humanos, debería apuntar a todas las cepas de STEC con las Stx inmunomoduladoras como estructura objetivo principal.

Paralelamente, se sabe que la dieta, las condiciones ambientales, y el manejo de los animales, tienen un profundo efecto en la prevalencia de STEC y la composición de la microbiota intestinal nativa. Por lo tanto, explorar en profundidad la microbiota intestinal del ganado, sus interacciones con STEC y los factores que los afectan, podría ofrecer soluciones viables para disminuir la prevalencia de las STEC y mejorar la salud de los animales.

Por otro lado, la elevada resistencia a los antimicrobianos y la transmisibilidad de algunas de las resistencias nos hacen reflexionar sobre su correcta utilización en el ganado y la necesidad de recurrir a otras técnicas de prevención y tratamiento, siempre que sea posible. En este sentido, sería interesante estudiar la microbiota y el uso de estrategias alternativas para lograr una reacción inmunitaria equilibrada que promueva la salud de los animales.

Finalmente, la secuenciación de los genomas de aislamientos de la región, y su registro en bases de datos, permitirá elucidar un mayor número de asociaciones entre las características moleculares y su relación con el estado clínico de los animales.

7 Anexo A. Perfiles genéticos de virulencia

Tabla 7.1 Perfiles únicos de virulencia en aislamientos recuperados de animales muertos

(n = 17)

Aislamiento	Origen	Perfil de virulencia
1.1	bazo	<i>iucD/ clpG</i>
1.2	bazo	<i>iucD/ afaE</i>
1.4	bazo	<i>iucD/ f17A/ papC</i>
1.7	bazo	<i>iucD/ afaE/ f17A/ papC</i>
1.9	hígado	<i>iucD/ clpG</i>
2.1	pulmón	<i>iucD/ afaE</i>
3.1	MF	<i>iucD/ eae/ cnf1/ ehxA/ stx1</i>
3.4	MF	<i>eae/ ehxA/ stx1</i>
3.5	MF	<i>f17A</i>
3.8	MF	<i>afaE/ clpG</i>
3.10	pulmón	<i>papC</i>
3.14	intestino	<i>papC</i>
3.19	intestino	<i>iucD/ eae/ cnf1/ stx1</i>
3.22	LMN	<i>papC</i>
4.1	riñón	*
4.3	bazo	*
4.5	líq. cefalorraquídeo	*
4.6	orina	*
5.1	riñón	*
5.2	hígado	*
5.3	corazón	*
6.1	MF	<i>iucD/ papC</i>
6.2	MF	<i>iucD/ eae/ ehxA</i>
6.4	MF	<i>eae/ ehxA</i>
7.1	pulmón	<i>iucD/ afaE/ clpG/ papC</i>
7.2	intestino	<i>iucD/ afaE/ clpG/ f17A</i>
7.3	intestino	<i>iucD/ afaE/ clpG/ f17A/ papC</i>
8.1	vejiga	*
8.4	vejiga	<i>f17A/ f17GI</i>
8.9	riñón	*
8.17	hígado	<i>iucD/ f17A/ f17GI</i>
8.18	hígado	<i>iucD</i>
8.19	hígado	*
8.21	hígado	<i>f17A/ f17GI</i>
9.1	intestino	<i>iucD/ f17A/ f17GI</i>
9.2	intestino	*
9.5	intestino	<i>iucD/ eae/ ehxA/ stx1</i>

10.1	intestino	*
10.2	intestino	<i>iucD/ eae/ ehxA/ stx1</i>
10.3	intestino	<i>iucD/ afaE</i>
10.4	pulmon	<i>iucD/ eae/ ehxA/ stx1</i>
10.5	pulmon	<i>iucD/ afaE</i>
10.6	LNM	<i>iucD/ eae/ ehxA/ stx1</i>
11.1	contenido intestinal	<i>iucD/ papC</i>
11.2	contenido intestinal	<i>iucD/ eae/ ehxA/ stx1</i>
12.1	MF	<i>iucD/ f17A/ f17GII/ cnf2/ cnf1/ cdtIII</i>
12.3	MF	<i>iucD/ f17A/ f17GII/ papC</i>
12.5	MF	*
12.6	intestino	*
12.7	intestino	<i>iucD/ papC</i>
13.1	SNC	<i>cdtIII/ ehxA/ papC</i>
13.2	SNC	<i>ehxA</i>
13.6	SNC	<i>papC</i>
14.1	ileon	<i>iucD/ clpG/ papC</i>
14.7	ileon	<i>iucD/ clpG/ f17A/ papC</i>
14.8	ileon	<i>clpG/ f17A/ f17GI</i>
14.10	LMN	<i>iucD/ clpG/ papC</i>
14.12	LMN	<i>iucD/ afaE/ clpG</i>
14.13	LMN	<i>iucD/ afaE/ clpG/ f17A</i>
15.1	MF	<i>iucD/ eae/ ehxA/ stx1</i>
15.3	MF	<i>iucD/ afaE/ eae/ ehxA/ stx1</i>
15.11	cerebro	<i>iucD/ eae/ ehxA/ stx1</i>
15.13	cerebro	<i>iucD/ afaE/ eae/ ehxA/ stx1</i>
15.15	cerebro	<i>iucD/ afaE/ eae/ stx1</i>
15.18	cerebro	<i>iucD/ afaE</i>
15.20	intestino	<i>iucD/ afaE/ f17A/ f17GII</i>
15.22	intestino	<i>iucD/ f17A/ f17GII</i>
15.23	intestino	<i>iucD/ afaE/ f17A/ f17GII/ papC</i>
15.29	intestino	<i>iucD/ afaE/ papC</i>
15.30	higado	<i>iucD/ eae/ ehxA/ stx1</i>
15.40	pulmon	<i>iucD/ eae/ ehxA/ stx1</i>
15.41	pulmon	*
15.42	pulmon	<i>iucD/ ehxA/ stx1</i>
15.50	LMN	<i>iucD/ afaE</i>
15.52	LMN	<i>iucD/ f17A/ f17GII</i>
15.53	LMN	<i>f17A/ f17GII</i>
15.58	LMN	<i>iucD/ afaE/ f17A/ f17GII</i>
16.1	intestino	<i>iucD/ afaE/ f17A/ f17GII</i>
16.2	intestino	<i>iucD/ afaE</i>
16.4	intestino	<i>iucD/ afaE/ f17A/ f17GII/ papC</i>
16.6	LNM	<i>iucD/ afaE</i>

16.9	contenido intestinal	<i>eae/ ehxA/ stx1</i>
17.1	hígado	*
17.2	hígado	<i>iucD/ afaE/ f17A</i>
17.3	hígado	<i>iucD/ afaE</i>

* Aislamientos en los que no se detectó ninguno de los genes estudiados. ** No se incluyeron en el estudio de diversidad intraespecífica *rep*-PCR. MF: materia fecal; LMN: linfonodo mesentérico.

Tabla 7.2 Perfiles únicos de virulencia en aislamientos recuperados de animales vivos

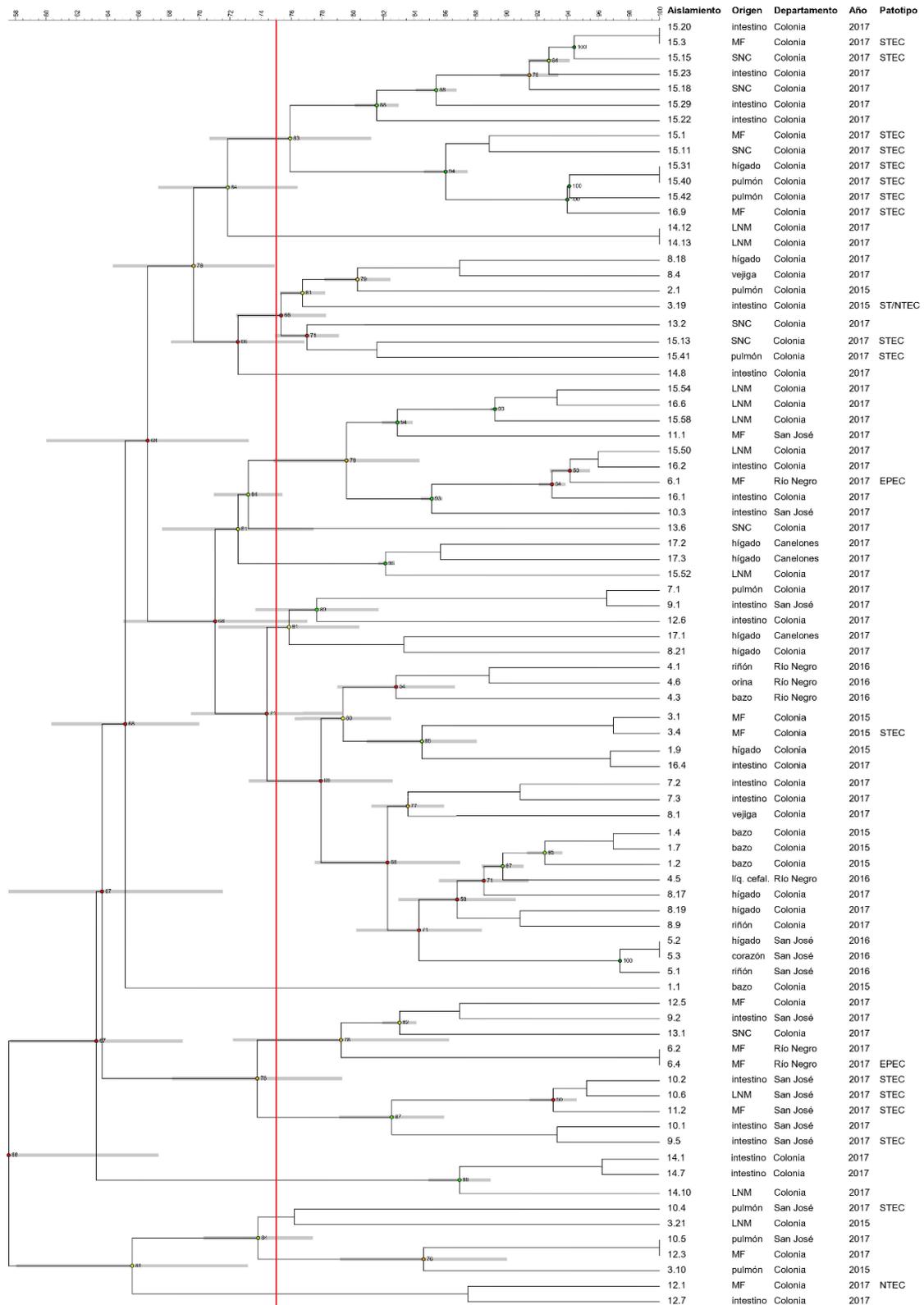
Aislamiento	Perfil de virulencia
18.1	<i>iucD/ papC</i>
18.2	<i>iucD/ afaE/ clpG/ f17A/ f17GII</i>
18.3	<i>iucD/ afaE/ papC</i>
18.5	<i>iucD/ afaE/ clpG/ f17A/ f17GII/ papC</i>
19.1	<i>clpG</i>
19.4	<i>iucD/ clpG</i>
20.1	<i>f17A/ f17GII</i>
20.2	<i>iucD/ f17A/ f17GII</i>
20.5	<i>iucD/ f17A/ f17GI</i>
21.1	<i>iucD/ papC</i>
21.2	<i>iucD/ afaE/ clpG/ f17A/ f17GII</i>
21.4	<i>iucD/ afaE/ f17A/ f17GII/ papC</i>
22.1	<i>f17A/ f17GII</i>
22.2	*
23.1	<i>f17A/ f17GII</i>
23.9	<i>iucD/ afaE/ f17A/ f17GII/ cnf2/ cnf1/ cdtIII</i>
24.1	*
24.2	<i>f17A</i>
25.1	<i>afaE/ clpG</i>
25.2	<i>afaE/ clpG/ papC</i>
25.7	<i>afaE</i>
26.1	<i>clpG/ papC</i>
26.2	<i>papC</i>
26.4	<i>clpG</i>
27.1	<i>papC</i>
27.2	<i>iucD/ clpG/ papC</i>
27.5	<i>iucD/ papC</i>
28.1	<i>iucD/ afaE/ clpG/ f17A/ f17GII</i>
28.5	<i>afaE/ clpG</i>
29.1	<i>eae/ ehxA/ stx1</i>
29.4	<i>iucD/ eae/ ehxA</i>
30.1	<i>iucD/ clpG/ papC</i>
30.2	*

- 30.3 *iucD/ clpG/ f17A/ f17GII/ papC*
31.1 *iucD/ f17A/ f17GII/ cnf2/ cnf1/ cdtIII*
32.1 *iucD/ afaE/ clpG/ eae/ ehxA/ papC*
32.2 *afaE/ clpG/ papC*
-

* Aislamientos en los que no se detectó ninguno de los genes estudiados. Todos los aislamientos se recuperaron de materia fecal (MF).

8 Anexo B Dendograma generado por ERIC- PCR

Figura 8.1 . Dendograma de toda la selección de aislamientos



La línea roja marca el punto de corte utilizado para definir variantes genéticas

9 Bibliografía

- Advisory Group on Integrated Surveillance of Antimicrobial Resistance (AGISAR) 2018. «Critically Important Antimicrobials for Human Medicine 6th Re.vision 2018. Ranking of medically important antimicrobials for risk management of antimicrobial resistance due to non-human use.» <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/312266/9789241515528-eng.pdf?ua=1>.
- Akiyama, Yumi, Hiroko Futai, Etsuko Saito, Kenichi Ogita, Hiroshi Sakae, Masaharu Fukunaga, Hidetaka Tsuji, Masatsugu Chikahira, y Atsushi Iguchi. 2017. «Shiga toxin subtypes and virulence genes in Escherichia coli isolated from cattle». *Japanese Journal of Infectious Diseases* 70 (2): 181-85. <https://doi.org/10.7883/yoken.JJID.2016.100>.
- Ames, Trevor R. 1997. «Dairy calf pneumonia. The disease and its impact.» *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice* 13 (3): 379-91. [https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30303-0](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30303-0).
- Ateba, Collins, y Moses Mbewe. 2014. «Genotypic Characterization of Escherichia coli O157:H7 Isolates from Different Sources in the North-West Province, South Africa, Using Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus PCR Analysis». *International Journal of Molecular Sciences* 15 (6): 9735-47. <https://doi.org/10.3390/ijms15069735>.
- Authority, European Food Safety (EFSA). 2017. «The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2015». *EFSA Journal*. Vol. 15. Wiley. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4694>.
- Bado, Inés. 2017. «Valor predictor de la colonización digestiva por bacilos Gram negativos multirresistentes para el tratamiento de infecciones nosocomiales en una UCI Tribunal»: *Tesis Doctoral en Ciencias Biomédicas. PRO.IN.BIO. Facultad de Medicina, Universidad de la Republica*.
- Badouei, Mahdi Askari, Taghi Zahraei Salehi, Mohammad Rabbani Khorasgani, Hasan

- Tadjbakhsh, y Gholamreza Nikbakht Brujeni. 2010. «Occurrence and characterisation of enterohaemorrhagic Escherichia coli isolates from diarrhoeic calves». *Comparative Clinical Pathology* 19 (3): 295-300. <https://doi.org/10.1007/s00580-009-0873-0>.
- Bae, Il Kwon, Juwon Kim, Je Young Hannah Sun, Seok Hoon Jeong, Yong Rok Kim, Kang Kyun Wang, y Kyungwon Lee. 2014. «Comparison of pulsed-field gel electrophoresis & repetitive sequence-based PCR methods for molecular epidemiological studies of Escherichia coli clinical isolates». *Indian Journal of Medical Research* 140 (5): 679-85. [/pmc/articles/PMC4311324/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24811324/).
- Bai, Jianfa, Xiaorong Shi, y T. G. Nagaraja. 2010. «A multiplex PCR procedure for the detection of six major virulence genes in Escherichia coli O157:H7». *Journal of Microbiological Methods* 82 (1): 85-89. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.05.003>.
- Balsalobre, Carlos, Joachim Morschhäuser, Jana Jass, Jörg Hacker, y Bernt Eric Uhlin. 2003. «Transcriptional analysis of the sfa determinant revealing multiple mRNA processing events in the biogenesis of S fimbriae in pathogenic Escherichia coli». *Journal of Bacteriology* 185 (2): 620-29. <https://doi.org/10.1128/JB.185.2.620-629.2003>.
- Batt, Carl A. 2014. *Escherichia Coli: Escherichia coli. Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00100-2>.
- Bauer, A W, W M M Kirby, J C Sherris, And M Turck, y Alexander Von Graevenitz. 1978. «Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method». *American Journal of Clinical Pathology* 45 (3): 493-96. [https://doi.org/10.1016/S0305-4179\(78\)80006-0](https://doi.org/10.1016/S0305-4179(78)80006-0).
- Bergan, Jonas, Anne Berit Dyve Lingelem, Roger Simm, Tore Skotland, y Kirsten Sandvig. 2012. «Shiga toxins». *Toxicon*. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.07.016>.
- Bertin, Anne. 1998. «Phenotypic expression of K88 adhesin alone or simultaneously with K99 and/or F41 adhesins in the bovine enterotoxigenic Escherichia coli strain B41».

Veterinary Microbiology 59 (4): 283-94. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(97\)00186-7](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(97)00186-7).

Bertin, Yolande, Christine Martin, Eric Oswald, y Jean Pierre Girardeau. 1996. «Rapid and specific detection of F17-related pilin and adhesin genes in diarrheic and septicemic *Escherichia coli* strains by multiplex PCR». *Journal of Clinical Microbiology* 34 (12): 2921-28. <https://doi.org/10.1128/jcm.34.12.2921-2928.1996>.

Bettelheim, Karl A. 2007. «The non-O157 Shiga-toxigenic (verocytotoxigenic) *Escherichia coli*; under-rated pathogens». *Critical Reviews in Microbiology*. Crit Rev Microbiol. <https://doi.org/10.1080/10408410601172172>.

Beutin, L., M. A. Montenegro, I. Orskov, F. Orskov, J. Prada, S. Zimmermann, y R. Stephan. 1989. «Close association of verotoxin (shiga-like toxin) production with enterohemolysin production in strains of *Escherichia coli*». *Journal of Clinical Microbiology* 27 (11): 2559-64. <https://doi.org/10.1128/jcm.27.11.2559-2564.1989>.

Beutin, L, S Zimmermann, y K Gleier. 1996. «Rapid detection and isolation of shiga-like toxin (verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* by direct testing of individual enterohemolytic colonies from washed sheep blood agar plates in the VTEC-RPLA assay.» *Journal of Clinical Microbiology* 34 (11).

Bielaszewska, Martina, Robin Köck, Alexander W Friedrich, Christof von Eiff, Lothar B Zimmerhackl, Helge Karch, y Alexander Mellmann. 2007. «Shiga toxin-mediated hemolytic uremic syndrome: Time to change the diagnostic paradigm?» *PLoS ONE* 2 (10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001024>.

Bihannic, Morgan, Reza Ghanbarpour, Frédéric Auvray, Laurent Cavalié, Pierre Châtre, Michèle Boury, Hubert Brugère, Jean Yves Madec, y Eric Oswald. 2014. «Identification and detection of three new F17 fimbrial variants in *Escherichia coli* strains isolated from cattle». *Veterinary Research* 45 (1): 1-12. <https://doi.org/10.1186/s13567-014-0076-9>.

Bok, Ewa, Aleksandra Kozańska, Justyna Mazurek-Popczyk, Magdalena Wojciech, y Katarzyna Baldy-Chudzik. 2020. «Extended phylogeny and extraintestinal virulence potential of commensal *Escherichia coli* from piglets and sows». *International Journal of Environmental Research and Public Health* 17 (1).

<https://doi.org/10.3390/ijerph17010366>.

- Bosman, A. B., J. A. Wagenaar, J. A. Stegeman, J. C.M. Vernooij, y D. J. Mevius. 2014. «Antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* in veal calves is associated with antimicrobial drug use». *Epidemiology and Infection* 142 (9): 1893-1904. <https://doi.org/10.1017/S0950268813002665>.
- Bost, S. Van, E. Jacquemin, E. Oswald, y J. Mainil. 2003. «Multiplex PCRs for Identification of Necrotoxigenic *Escherichia coli*». *Journal of Clinical Microbiology* 41 (9): 4480-82. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.9.4480-4482.2003>.
- Bost, Sigrid Van, Marie Hélène Bâbe, Etienne Jacquemin, y Jacques Mainil. 2001. «Characteristics of necrotoxigenic *Escherichia coli* isolated from septicemic and diarrheic calves between 1958 and 1970». *Veterinary Microbiology* 82 (4): 311-20. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(01\)00395-9](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(01)00395-9).
- Bouguéneq, Chantal Le, y Yolande Bertin. 1999. «AFA and F17 adhesins produced by pathogenic *Escherichia coli* strains in domestic animals». *Veterinary Research*. [https://doi.org/10.1016/S0928-4249\(99\)80023-6](https://doi.org/10.1016/S0928-4249(99)80023-6).
- Brolund, Alma, Sara Hægman, Petra J. Edquist, Lena Gezelius, Barbro Olsson-Liljequist, Karin Tegmark Wisell, y Christian G. Giske. 2010. «The DiversiLab system versus pulsed-field gel electrophoresis: Characterisation of extended spectrum β -lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*». *Journal of Microbiological Methods* 83 (2): 224-30. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.09.004>.
- Brooks, John T., Evangeline G. Sowers, Joy G. Wells, Katherine D. Greene, Patricia M. Griffin, Robert M. Hoekstra, y Nancy A. Strockbine. 2005. «Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in the United States, 1983-2002». *Journal of Infectious Diseases* 192 (8): 1422-29. <https://doi.org/10.1086/466536>.
- Bryson, D G. 1985. «Symposium on Bovine Respiratory Disease Calf Pneumonia».
- Byappanahalli, Muruleedhara N., Richard L. Whitman, Dawn A. Shively, John Ferguson, Satoshi Ishii, y Michael J. Sadowsky. 2007. «Population structure of *Cladophora*-borne *Escherichia coli* in nearshore water of Lake Michigan». *Water Research* 41

(16): 3649-54. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.03.009>.

Cap, Mariana, Claudia C. Carbonari, Beatriz A. D'Astek, Gisela Zolezzi, Natalia Deza, Martin P. Palladino, Marcelo Masana, Isabel Chinen, y Marta Rivas. 2019. «Frequency, characterization and genotypic analysis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef slaughterhouses of Argentina». *Revista Argentina de Microbiologia* 51 (1): 32-38. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2018.03.005>.

Caprioli, Alfredo, Stefano Morabito, Hubert Brugère, y Eric Oswald. 2005. «Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: Emerging issues on virulence and modes of transmission». *Veterinary Research. Vet Res.* <https://doi.org/10.1051/vetres:2005002>.

Carattoli, Alessandra. 2013. «Plasmids and the spread of resistance». *International Journal of Medical Microbiology* 303 (6-7): 298-304. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.02.001>.

Cardozo, Andrea. 2020. «Asignación de grupos filogenéticos a cepas de *Escherichia coli* productoras de Toxina Shiga LEE-positivas , asociadas a diarrea neonatal de terneros».

Cavaco, L. M., H. Hasman, S. Xia, y F. M. Aarestrup. 2009. «*qnrD*, a novel gene conferring transferable quinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar Kentucky and Bovismorbificans strains of human origin». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53 (2): 603-8. <https://doi.org/10.1128/AAC.00997-08>.

CDC PulseNet. 2017. «Standard Operating Procedure for PulseNet PFGE of *Escherichia coli* O157: H7, *Escherichia coli* non-O157 (STEC), *Salmonella* serotypes, *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri*» 157 (PNL05): 1-16. <https://doi.org/10.1089/fpd.2006.3.59>.

Cerda, Jaime, Claudio Vera, y Gabriel Rada. 2013. «Odds ratio: Aspectos teóricos y prácticos». *Revista Medica de Chile* 141 (10): 1329-35. <https://doi.org/10.4067/S0034-98872013001000014>.

Chandran, Abhirosh, y Asit Mazumder. 2014. «Occurrence of diarrheagenic virulence genes and genetic diversity in *Escherichia coli* isolates from fecal material of various

- avian hosts in British Columbia, Canada». *Applied and Environmental Microbiology* 80 (6): 1933-40. <https://doi.org/10.1128/AEM.03949-13>.
- Choudhary, Mamta, Binod Kumar Choudhary, Ratan Chandra Ghosh, Smita Bhojar, Sandeep Chaudhari, y Sukhadeo B. Barbuddhe. 2019. «Cultivable microbiota and pulmonary lesions in polymicrobial bovine pneumonia». *Microbial Pathogenesis* 134 (septiembre). <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103577>.
- Clermont, O., C. Couffignal, J. Blanco, F. Mentré, B. Picard, y E. Denamur. 2017. «Two levels of specialization in bacteraemic *Escherichia coli* strains revealed by their comparison with commensal strains». *Epidemiology and Infection* 145 (5): 872-82. <https://doi.org/10.1017/S0950268816003010>.
- Clermont, O, S Bonacorsi, y E Bingen. 2000. «Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group.» *Applied and environmental microbiology* 66 (10): 4555-58. <https://doi.org/10.1128/aem.66.10.4555-4558.2000>.
- Clermont, Olivier, Julia K Christenson, Erick Denamur, y David M Gordon. 2013. «The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: Improvement of specificity and detection of new phylo-groups». *Environmental Microbiology Reports* 5 (1): 58-65. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12019>.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2018. «M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing A CLSI supplement for global application. 28th Edition». www.clsi.org.
- Conway, Tyrrell, y Paul S. Cohen. 2015. «Commensal and Pathogenic *Escherichia coli* Metabolism in the Gut». *Microbiology spectrum* 3 (3). <https://doi.org/10.1128/MICROBIOLSPEC.MBP-0006-2014>.
- Coppola, Nadia, Bibiana Freire, Ana Umpiérrez, Nicolás F. Cordeiro, Pablo Ávila, Gustavo Trenchi, Gustavo Castro, et al. 2020. «Transferable Resistance to Highest Priority Critically Important Antibiotics for Human Health in *Escherichia coli* Strains Obtained From Livestock Feces in Uruguay». *Frontiers in Veterinary Science* 7 (November). <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.588919>.
- Cornick, Nancy A., Sheridan L. Booher, y Harley W. Moon. 2002. «Intimin facilitates

- colonization by *Escherichia coli* O157:H7 in adult ruminants». *Infection and Immunity* 70 (5): 2704-7. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.5.2704-2707.2002>.
- Croxen, Matthew A., y B. Brett Finlay. 2010. «Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity». *Nature Reviews Microbiology* 8 (1): 26-38. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2265>.
- Croxen, Matthew A., Robyn J. Law, Roland Scholz, Kristie M. Keeney, Marta Wlodarska, y B. Brett Finlay. 2013. «Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*». *Clinical Microbiology Reviews*. American Society for Microbiology (ASM). <https://doi.org/10.1128/CMR.00022-13>.
- Dean-Nystrom, E. A., B. T. Bosworth, H. W. Moon, y A. D. O'Brien. 1998. «*Escherichia coli* O157:H7 requires intimin for enteropathogenicity in calves». *Infection and Immunity* 66 (9): 4560-63. <https://doi.org/10.1128/.66.9.4560-4563.1998>.
- Denamur, Erick, Olivier Clermont, Stéphane Bonacorsi, y David Gordon. 2020. «The population genetics of pathogenic *Escherichia coli*». *Nature Reviews Microbiology*, 21 de agosto de 2020. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0416-x>.
- Diemen, Pauline M. Van, Francis Dziva, Mark P. Stevens, y Timothy S. Wallis. 2005. «Identification of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26:H- genes required for intestinal colonization in calves». *Infection and Immunity* 73 (3): 1735-43. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.3.1735-1743.2005>.
- Donovan, G. Arthur, Ian R. Dohoo, David M. Montgomery, y Fred L. Bennett. 1998. «Calf and disease factors affecting growth in female Holstein calves in Florida, USA». *Preventive Veterinary Medicine* 33 (1-4): 1-10. [https://doi.org/10.1016/S0167-5877\(97\)00059-7](https://doi.org/10.1016/S0167-5877(97)00059-7).
- Dowling, Patricia M. 2013. «Aminoglycosides and Aminocyclitols». En *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*, 233-55. Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781118675014.ch14>.
- Duijkeren, Engeline van, Anne-Kathrin Schink, Marilyn C. Roberts, Yang Wang, y Stefan Schwarz. 2018. «Mechanisms of Bacterial Resistance to Antimicrobial Agents». En *Antimicrobial Resistance in Bacteria from Livestock and Companion*

Animals, 51-82. Washington, DC, USA: ASM Press.
<https://doi.org/10.1128/9781555819804.ch4>.

Ejrnaes, Karen, Dorthe Sandvang, Bettina Lundgren, Sven Ferry, Stig Holm, Tor Monsen, Rolf Lundholm, y Niels Frimodt-Moller. 2006. «Pulsed-field gel electrophoresis typing of Escherichia coli strains from samples collected before and after pivmecillinam or placebo treatment of uncomplicated community-acquired urinary tract infection in women». *Journal of Clinical Microbiology* 44 (5): 1776-81. <https://doi.org/10.1128/JCM.44.5.1776-1781.2006>.

Ernst, Deborah. 2017. «Subtipificación de toxinas Shiga en STEC de origen bovino en Uruguay». Universidad de la República (Uruguay). Facultad de Ciencia.
<https://hdl.handle.net/20.500.12008/19188>.

Fecteau, G., J. M. Fairbrother, R. Higgins, D. C. Van Metre, J. Paré, B. P. Smith, C. A. Holmberg, y S. Jang. 2001. «Virulence factors in Escherichia coli isolated from the blood of bacteremic neonatal calves». *Veterinary Microbiology* 78 (3): 241-49.
[https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(00\)00299-6](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(00)00299-6).

Fecteau, Gilles, Bradford P. Smith, y Lisle W. George. 2009. «Septicemia and Meningitis in the Newborn Calf». *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*.
<https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2008.10.004>.

Fekete, Péter Zsolt, György Schneider, Ferenc Olasz, Gabriele Blum-Oehler, Jörg H. Hacker, y Béla Nagy. 2003. «Detection of a plasmid-encoded pathogenicity island in F18+ enterotoxigenic and verotoxigenic Escherichia coli from weaned pigs». *International Journal of Medical Microbiology* 293 (4): 287-98.
<https://doi.org/10.1078/1438-4221-00269>.

Finlay, B B, y S Falkow. 1997. «Common themes in microbial pathogenicity revisited.» *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR* 61 (2): 136-69.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9184008>.

Foley, Steven L., Aaron M. Lynne, y Rajesh Nayak. 2009. «Molecular typing methodologies for microbial source tracking and epidemiological investigations of Gram-negative bacterial foodborne pathogens». *Infection, Genetics and Evolution*.
<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.03.004>.

- Foster, D. M., y Geof W. Smith. 2009. «Pathophysiology of Diarrhea in Calves». *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*. Vet Clin North Am Food Anim Pract. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2008.10.013>.
- Franck, S. M., B. T. Bosworth, y H. W. Moon. 1998. «Multiplex PCR for enterotoxigenic, attaching and effacing, and shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from calves». *Journal of Clinical Microbiology* 36 (6): 1795-97.
- Frankel, Gad, Alan D. Phillips, Ilan Rosenshine, Gordon Dougan, James B. Kaper, y Stuart Knutton. 1998. «Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: More subversive elements». *Molecular Microbiology*. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.01144.x>.
- Fratamico, Pina M., Chitrita DebRoy, Yanhong Liu, David S. Needleman, Gian Marco Baranzoni, y Peter Feng. 2016. «Advances in Molecular Serotyping and Subtyping of *Escherichia coli*†». *Frontiers in Microbiology* 7 (MAY): 1-8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00644>.
- Fuller, Cynthia A., Christine A. Pellino, Michael J. Flagler, Jane E. Strasser, y Alison A. Weiss. 2011. «Shiga toxin subtypes display dramatic differences in potency». *Infection and Immunity* 79 (3): 1329-37. <https://doi.org/10.1128/IAI.01182-10>.
- G.M. Gonzalez, Alice, y Aloysio M.F. Cerqueira. 2020. «Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in the animal reservoir and food in Brazil». *Journal of Applied Microbiology* 128 (6): 1568-82. <https://doi.org/10.1111/jam.14500>.
- Gall, Tony Le, Olivier Clermont, Stéphanie Gouriou, Bertrand Picard, Xavier Nassif, Erick Denamur, y Olivier Tenaillon. 2007a. «Extraintestinal virulence is a coincidental by-product of commensalism in b2 phylogenetic group *Escherichia coli* strains». *Molecular Biology and Evolution* 24 (11): 2373-84. <https://doi.org/10.1093/molbev/msm172>.
- . 2007b. «Extraintestinal virulence is a coincidental by-product of commensalism in b2 phylogenetic group *Escherichia coli* strains». *Molecular Biology and Evolution* 24 (11): 2373-84. <https://doi.org/10.1093/molbev/msm172>.
- Gérardin, J., L. Lalioui, E. Jacquemin, C. Le Bouguéneq, y J.G. Mainil. 2000. «The afa-

- related gene cluster in necrotoxicogenic and other *Escherichia coli* from animals belongs to the afa-8 variant». *Veterinary Microbiology* 76 (2): 175-84. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(00\)00234-0](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(00)00234-0).
- Ghanbarpour, Reza, y Mohammad N. Nazem. 2010. «Prevalence of aerobactin and adhesin genes in *Escherichia coli* isolates from blood of bacteremic severely ill neonatal calves». *Veterinarski Arhiv* 80 (2): 185-94.
- Ghanbarpour, Reza, y Eric Oswald. 2010. «Phylogenetic distribution of virulence genes in *Escherichia coli* isolated from bovine mastitis in Iran». *Research in Veterinary Science* 88 (1): 6-10. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2009.06.003>.
- Girardeau, Jean Pierre, Lila Lalioui, A. Mohamed Ou Said, Christophe De Champs, y Chantal Le Bouguéneq. 2003. «Extended virulence genotype of pathogenic *Escherichia coli* isolates carrying the afa-8 operon: Evidence of similarities between isolates from humans and animals with extraintestinal infections». *Journal of Clinical Microbiology* 41 (1): 218-26. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.1.218-226.2003>.
- Girardeau, Jean Pierre, Maurice Der Vartanian, Jean Luc Ollier, y Michel Contrepois. 1988. «CS31A, a new K88-related fimbrial antigen on bovine enterotoxigenic and septicemic *Escherichia coli* strains». *Infection and Immunity* 56 (8): 2180-88. <https://doi.org/10.1128/iai.56.8.2180-2188.1988>.
- Gomez, Diego E., Klíbs N. Galvão, Juan C. Rodríguez-Lecompte, y Marcio C. Costa. 2019. «The Cattle Microbiota and the Immune System: An Evolving Field». *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*. W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2019.08.002>.
- Gyles, C. L. 2007. «Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview.» *Journal of animal science* 85 (13 Suppl). <https://doi.org/10.2527/jas.2006-508>.
- Gyles, C. L., y J. M. Fairbrother. 2010. «*Escherichia Coli*». En *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals: Fourth Edition*, 267-308. Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1002/9780470958209.ch15>.
- Hazen, Tracy H., Jason W. Sahl, Claire M. Fraser, Michael S. Donnenberg, Flemming

- Scheutz, y David A. Rasko. 2013. «Refining the pathovar paradigm via phylogenomics of the attaching and effacing *Escherichia coli*». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (31): 12810-15. <https://doi.org/10.1073/pnas.1306836110>.
- Hoey, D. E.Elaine, Carol Currie, Roderick W. Else, Anita Nutikka, Clifford A. Lingwood, David L. Gally, y David G.E. Smith. 2002. «Expression of receptors for verotoxin 1 from *Escherichia coli* 0157 on bovine intestinal epithelium». *Journal of Medical Microbiology* 51 (2): 143-49. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-51-2-143>.
- Hong, Bin Kim, Hye Park Chi, Jong Kim Chung, Eui Chong Kim, George A. Jacoby, y David C. Hooper. 2009. «Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants over a 9-year period». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53 (2): 639-45. <https://doi.org/10.1128/AAC.01051-08>.
- Hopkins, Katie L., Robert H. Davies, y E. John Threlfall. 2005. «Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: Recent developments». *International Journal of Antimicrobial Agents*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2005.02.006>.
- Ishii, Satoshi, y Michael J. Sadowsky. 2009. «Applications of the rep-PCR DNA fingerprinting technique to study microbial diversity, ecology and evolution: Minireview». *Environmental Microbiology* 11 (4): 733-40. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01856.x>.
- Jajarmi, Maziar, Abbas Ali Imani Fooladi, Mahdi Askari Badouei, y Ali Ahmadi. 2017. «Virulence genes, Shiga toxin subtypes, major O-serogroups, and phylogenetic background of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from cattle in Iran». *Microbial Pathogenesis* 109 (3): 274-79. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.05.041>.
- Jang, J., H. G. Hur, M. J. Sadowsky, M. N. Byappanahalli, T. Yan, y S. Ishii. 2017. «Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications—a review». *Journal of Applied Microbiology*. Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/jam.13468>.
- Jenkins, Claire, Neil T. Perry, Tom Cheasty, Darren J. Shaw, Gad Frankel, Gordon

- Dougan, George J. Gunn, Henry R. Smith, Adrienne W. Paton, y James C. Paton. 2003. «Distribution of the saa gene in strains of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* of human and bovine origins». *Journal of Clinical Microbiology* 41 (4): 1775-78. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.4.1775-1778.2003>.
- Jerse, Ann E., Jun Yu, Ben D. Tall, y James B. Kaper. 1990. «A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87 (20): 7839-43. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.20.7839>.
- Jobling, Michael G. 2016. «The chromosomal nature of LT-II enterotoxins solved: a lambdoid prophage encodes both LT-II and one of two novel pertussis-toxin-like toxin family members in type II enterotoxigenic *Escherichia coli*». *Pathogens and disease* 74 (3): 1. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftw001>.
- Johnson, James R. 1991. «Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection». *Clinical Microbiology Reviews* 4 (1): 80-128. <https://doi.org/10.1128/CMR.4.1.80>.
- Johnson, James R., Andrew C. Murray, Abby Gajewski, Maureen Sullivan, Paula Snippes, Michael A. Kuskowski, y Kirk E. Smith. 2003. «Isolation and Molecular Characterization of Nalidixic Acid-Resistant Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* from Retail Chicken Products». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47 (7): 2161. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.7.2161-2168.2003>.
- Johnson, James R., y Thomas A. Russo. 2018. «Molecular Epidemiology of Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*». *EcoSal Plus* 8 (1). <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.esp-0004-2017>.
- Kaper, James B., James P. Nataro, y Harry L.T. Mobley. 2004. «Pathogenic *Escherichia coli*». *Nature Reviews Microbiology*. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrmicro818>.
- Karch, Helge, Thomas Meyer, Holger Russmann, y Jurgen Heesemann. 1992. «Frequent Loss of Shiga-Like Toxin Genes in Clinical Isolates of *Escherichia coli* upon Subcultivation». *INFECrION AND IMMUNITY*.

- Kieckens, E., J. Rybarczyk, R. W. Li, D. Vanrompay, y E. Cox. 2016. «Potential immunosuppressive effects of Escherichia coli O157: H7 experimental infection on the bovine host». *BMC Genomics* 17 (1): 1049. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-3374-y>.
- Köhler, Christian Daniel, y Ulrich Dobrindt. 2011. «What defines extraintestinal pathogenic Escherichia coli?» *International Journal of Medical Microbiology*, diciembre de 2011. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2011.09.006>.
- Kolenda, RafaÅ, RafaÅ, MichaÅ, MichaÅ Burdukiewicz, y Peter Schierack. 2015. «A systematic review and meta-analysis of the epidemiology of pathogenic Escherichia coli of calves and the role of calves as reservoirs for human pathogenic E. coli». *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 5 (March). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2015.00023>.
- Korhonen, T. K., V. Vaisanen-Rhen, y M. Rhen. 1984. «Escherichia coli fimbriae recognizing sialyl galactosides». *Journal of Bacteriology* 159 (2): 762-66. <https://doi.org/10.1128/jb.159.2.762-766.1984>.
- KotÅowski, Roman, Katarzyna Grecka, Barbara Kot, y Piotr Szweda. 2020. «New approaches for Escherichia coli genotyping». *Pathogens* 9 (2). <https://doi.org/10.3390/pathogens9020073>.
- Labigne-Roussel, A., y S. Falkow. 1988. «Distribution and degree of heterogeneity of the afimbrial-adhesin-encoding operon (afa) among uropathogenic Escherichia coli isolates». *Infection and Immunity* 56 (3): 640-48. <https://doi.org/10.1128/iai.56.3.640-648.1988>.
- Lalioui, L., y C. Le Bouguéneç. 2001. «afa-8 Gene cluster is carried by a pathogenicity island inserted into the tRNAPhe of human and bovine pathogenic Escherichia coli isolates». *Infection and Immunity* 69 (2): 937-48. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.2.937-948.2001>.
- Lalioui, Lila, Mabel Jouve, Pierre Gounon, y Chantal Le Bouguenec. 1999. «Molecular cloning and characterization of the afa-7 and afa-8 gene clusters encoding afimbrial adhesins in Escherichia coli strains associated with diarrhea or septicemia in calves». *Infection and Immunity* 67 (10): 5048-59. <https://doi.org/10.1128/iai.67.10.5048->

5059.1999.

Lane, M. C., y H. L.T. Mobley. 2007. «Role of P-fimbrial-mediated adherence in pyelonephritis and persistence of uropathogenic Escherichia coli (UPEC) in the mammalian kidney». *Kidney International* 72 (1): 19-25. <https://doi.org/10.1038/sj.ki.5002230>.

Leimbach, Andreas, Jörg Hacker, y Ulrich Dobrindt. 2013. «E. coli as an all-rounder: The thin line between commensalism and pathogenicity». *Current Topics in Microbiology and Immunology* 358: 3-32. https://doi.org/10.1007/82_2012_303.

Liu, Ming, Marcus Ho Yin Wong, y Sheng Chen. 2013. «Molecular characterisation of a multidrug resistance conjugative plasmid from *Vibrio parahaemolyticus*». *International Journal of Antimicrobial Agents* 42 (6): 575-79. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2013.08.014>.

Lorenz, Ingrid, Bernadette Earley, John Gilmore, Ian Hogan, Emer Kennedy, y Simon J. More. 2011. «Calf health from birth to weaning. III. housing and management of calf pneumonia». *Irish Veterinary Journal* 64 (1): 14. <https://doi.org/10.1186/2046-0481-64-14>.

Lorenz, Ingrid, John Fagan, y Simon J More. 2011. «Calf health from birth to weaning. II. Management of diarrhoea in pre-weaned calves.» *Irish veterinary journal* 64 (1): 9. <https://doi.org/10.1186/2046-0481-64-9>.

Louge, Enrique. 2016. «Circulación y caracterización molecular de Rotavirus y Escherichia coli asociados a diarrea neonatal y septicemia en terneros». Facultad de Ciencias Veterinarias U.N.C.P.B.A.

Maciel, Jonas Fernandes, Letícia Beatriz Matter, Caiane Tasca, Daniela Alessandra Rambo Scheid, Letícia Trevisan Gressler, Rosângela Estel Ziech, y Agueda Castagna De Vargas. 2019. «Characterization of intestinal Escherichia coli isolated from calves with diarrhea due to rotavirus and coronavirus». *Journal of Medical Microbiology* 68 (3): 417-23. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000937>.

Madoshi, Balichene P, Egle Kudirkiene, Madundo M. A. Mtambo, Amandus P Muhairwa, Athumani M Lupindu, y John E Olsen. 2016. «Characterisation of

- Commensal *Escherichia coli* Isolated from Apparently Healthy Cattle and Their Attendants in Tanzania». Editado por Massimiliano Galdiero. *PLOS ONE* 11 (12): e0168160. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168160>.
- Mainil, J. G., G. Daube, E. Jacquemin, P. Pohl, y A. Kaeckenbeeck. 1998. «Virulence plasmids of enterotoxigenic *Escherichia coli* isolates from piglets». *Veterinary Microbiology* 62 (4): 291-301. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(98\)00225-9](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(98)00225-9).
- Mainil, J. G., J. Gérardin, y E. Jacquemin. 2000. «Identification of the F17 fimbrial subunit- and adhesin-encoding (f17A and f17G) gene variants in necrotoxicogenic *Escherichia coli* from cattle, pigs and humans». *Veterinary Microbiology* 73 (4): 327-35. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(00\)00179-6](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(00)00179-6).
- Mainil, J.G. G., y G. Daube. 2005. «Verotoxigenic *Escherichia coli* from animals, humans and foods: Who's who?» En *Journal of Applied Microbiology*, 98:1332-44. *J Appl Microbiol*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02653.x>.
- Mainil, Jacques. 2013. «*Escherichia coli* virulence factors». *Veterinary Immunology and Immunopathology* 152 (1-2): 2-12. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2012.09.032>.
- Manges, Anee R., Hyun Min Geum, Alice Guo, Thaddeus J. Edens, Chad D. Fibke, y Johann D.D. Pitout. 2019. «Global extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) lineages». *Clinical Microbiology Reviews* 32 (3): 1-25. <https://doi.org/10.1128/CMR.00135-18>.
- Marcé, C., R. Guatteo, N. Bareille, y C. Fourichon. 2010. «Dairy calf housing systems across Europe and risk for calf infectious diseases». *Animal* 4 (9): 1588-96. <https://doi.org/10.1017/S1751731110000650>.
- Margueritte, J, N. Mattion, J Blackhall, F Fernández, V Parreño, A Vagnozzi, A Odeón, y G Combessies. 2007. «Diarrea Neonatal En Terneros De Rodeos De Cría : Su Prevención Y Tratamiento». *Sitio Argentino de Producción Animal*, 3. www.produccion-animal.com.ar.
- Marshall, Bonnie M., y Stuart B. Levy. 2011. «Food animals and antimicrobials: Impacts on human health». *Clinical Microbiology Reviews*. <https://doi.org/10.1128/CMR.00002-11>.

- Martínez, José L., Marta Herrero, y Victor de Lorenzo. 1994. «The organization of intercistronic regions of the aerobactin operon of pCoIV-K30 may account for the differential expression of the iucABCD iutA genes». *Journal of Molecular Biology* 238 (2): 288-93. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1994.1290>.
- Martino, P. Di, Y. Bertin, J. P. Girardeau, V. Livrelli, B. Joly, y A. Darfeuille- Michaud. 1995. «Molecular characterization and adhesive properties of CF29K, an adhesin of *Klebsiella pneumoniae* strains involved in nosocomial infections». *Infection and Immunity* 63 (11): 4336-44. <https://doi.org/10.1128/iai.63.11.4336-4344.1995>.
- Mellmann, Alexander, Dag Harmsen, Craig A. Cummings, Emily B. Zentz, Shana R. Leopold, Alain Rico, Karola Prior, et al. 2011. «Prospective genomic characterization of the german enterohemorrhagic *Escherichia coli* O104:H4 outbreak by rapid next generation sequencing technology». *PLoS ONE* 6 (7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022751>.
- Melton-Celsa, Angela R. 2014. «Shiga Toxin (Stx) Classification, Structure, and Function». *Microbiology Spectrum* 2 (4). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ehec-0024-2013>.
- Menge, Christian. 2020. «The Role of *Escherichia coli* Shiga Toxins in STEC Colonization of Cattle.» *Toxins* 12 (9): 1-37. <https://doi.org/10.3390/toxins12090607>.
- Mercado, E. C., S. M. Rodríguez, A. L. D'Antuono, A. L. Cipolla, A. M. Elizondo, C. A. Rossetti, R. Malena, y M. A. Méndez. 2003. «Occurrence and characteristics of CS31A antigen-producing *Escherichia coli* in calves with diarrhoea and septicaemia in Argentina». *Journal of Veterinary Medicine, Series B* 50 (1): 8-13. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0450.2003.00610.x>.
- Meza-Segura, Mario, Mussaret Bano Zaidi, Samantha Maldonado-Puga, Jazmin Huerta-Cantillo, Lucia Chavez-Dueñas, Fernando Navarro-Garcia, y Teresa Estrada-Garcia. 2017. «Cytotoxic distending toxin-producing *Escherichia coli* strains causing severe diarrhoea in young Mexican children». *JMM Case Reports* 4 (2). <https://doi.org/10.1099/jmmcr.0.005079>.
- Mir, Raies A., y Indira T. Kudva. 2019. «Antibiotic-resistant Shiga toxin-producing

- Escherichia coli: An overview of prevalence and intervention strategies». *Zoonoses and Public Health* 66 (1): 1-13. <https://doi.org/10.1111/zph.12533>.
- Mokady, Daphna, Uri Gophna, y Eliora Z. Ron. 2005. «Virulence factors of septicemic Escherichia coli strains». *International Journal of Medical Microbiology*. Elsevier GmbH. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2005.07.007>.
- Mora, Azucena, Jesús E. Jorge Blanco, Miguel Blanco, M. Pilar Alonso, Ghizlane Dhabí, Aurora Echeita, Enrique A. González, M. Isabel Bernárdez, y Jesús E. Jorge Blanco. 2005. «Antimicrobial resistance of Shiga toxin (verotoxin)-producing Escherichia coli O157:H7 and non-O157 strains isolated from humans, cattle, sheep and food in Spain». *Research in Microbiology* 156 (7): 793-806. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2005.03.006>.
- Nagy, Béla, y Péter Zs Fekete. 2005. «Enterotoxigenic Escherichia coli in veterinary medicine». *International Journal of Medical Microbiology* 295 (6-7): 443-54. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2005.07.003>.
- Nagy, Béla, y Péter Zs Fekete. 1999. «Enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC) in farm animals». *Veterinary Research*. Vol. 30. <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00902569>.
- Nataro, James P., y James B. Kaper. 1998. «Diarrheagenic Escherichia coli». *Clinical Microbiology Reviews*. American Society for Microbiology. <https://doi.org/10.1128/cmr.11.1.142>.
- Nguyen, Tan Duc, Thin Thanh Vo, y Hung Vu-Khac. 2011. «Virulence factors in Escherichia coli isolated from calves with diarrhea in Vietnam» 12 (2): 159-64. <https://doi.org/10.4142/jvs.2011.12.2.159>.
- Octavia S, Lan R. In: editors. *The Prokaryotes*. Berlin, Heidelberg, Springer, 2014, p. 225-286. 2014. *The Family Enterobacteriaceae*. In *The Prokaryotes*. Editado por Thompson F Rosenberg E, DeLong EF, Lory S, Stackebrandt E. Berlin, Heidelberg: Springer.
- Oficina de estadísticas agropecuarias (DIEA)/ Ministerio de ganadería agricultura y pesca (MGAP). 2017. «Anuario estadístico agropecuario 2017», 214.

———. 2020. «Anuario estadístico agropecuario 2020», 255.

Olive, D. M. 1989. «Detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* after polymerase chain reaction amplification with a thermostable DNA polymerase». *Journal of Clinical Microbiology* 27 (2): 261-65. <https://doi.org/10.1128/jcm.27.2.261-265.1989>.

Omattage, Natalie S, Zengqin Deng, Jerome S Pinkner, Karen W Dodson, Fredrik Almqvist, Peng Yuan, y Scott J Hultgren. 2018. «Structural basis for usher activation and intramolecular subunit transfer in P pilus biogenesis in *Escherichia coli*». *Nature Microbiology*. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0255-y>.

Ott, Manfred, Jörg Hacker, Thomas Schmoll, Thomas Jarchau, Timo K. Korhonen, y Werner Goebel. 1986. «Analysis of the genetic determinants coding for the S-fimbrial adhesin (sfa) in different *Escherichia coli* strains causing meningitis or urinary tract infections». *Infection and Immunity* 54 (3): 646-53. <https://doi.org/10.1128/iai.54.3.646-653.1986>.

Otto, B. R., A. M.J.J. Verweij-Van Vught, y D. M. Maclaren. 1992. «Transferrins and heme-compounds as iron sources for pathogenic bacteria». *Critical Reviews in Microbiology* 18 (3): 217-33. <https://doi.org/10.3109/10408419209114559>.

Otto, B R, J G Kusters, J Luirink, F K de Graaf, y B Oudega. 1996. «Molecular characterization of a heme-binding protein of *Bacteroides fragilis* BE1.» *Infection and Immunity* 64 (10).

Pacheco, Alline R., y Vanessa Sperandio. 2012. «Shiga toxin in enterohemorrhagic *E.coli*: regulation and novel anti-virulence strategies.» *Frontiers in cellular and infection microbiology*. *Front Cell Infect Microbiol*. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00081>.

Paddock, Zachary, Xiaorong Shi, Jianfa Bai, y T. G. Nagaraja. 2012. «Applicability of a multiplex PCR to detect O26, O45, O103, O111, O121, O145, and O157 serogroups of *Escherichia coli* in cattle feces 1». *Veterinary Microbiology* 156 (3-4): 381-88. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.11.017>.

Park, Chi Hye, Ari Robicsek, George A. Jacoby, Daniel Sahm, y David C. Hooper. 2006. «Prevalence in the United States of aac(6')-Ib-cr encoding a ciprofloxacin-

- modifying enzyme». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50 (11): 3953-55. <https://doi.org/10.1128/AAC.00915-06>.
- Paton, A. W., y J. C. Paton. 2002. «Direct Detection and Characterization of Shiga Toxigenic *Escherichia coli* by Multiplex PCR for stx1, stx2, eae, ehxA, and saa». *Journal of Clinical Microbiology* 40 (1): 271-74. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.1.271-274.2002>.
- Paton, Adrienne W., y James C Paton. 1998. «Detection and characterization of shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for stx1, stx2, eaeA, enterohemorrhagic *E. coli* hlyA, rfb(O111), and rfb(O157)». *Journal of Clinical Microbiology* 36 (2): 598-602.
- Patzi-Vargas, Sandra, Mussaret Bano Zaidi, Iza Perez-Martinez, Magda León–Cen, Alba Michel-Ayala, Damien Chaussabel, y Teresa Estrada-Garcia. 2015. «Diarrheagenic *Escherichia coli* Carrying Supplementary Virulence Genes Are an Important Cause of Moderate to Severe Diarrhoeal Disease in Mexico». Editado por Mathieu Picardeau. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 9 (3): e0003510. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003510>.
- Pedroso, M. Z., E. Freymuller, L. R. Trabulsi, y T. A.T. Gomes. 1993. «Attaching-effacing lesions and intracellular penetration in HeLa cells and human duodenal mucosa by two *Escherichia coli* strains not belonging to the classical enteropathogenic *E. coli* serogroups». *Infection and Immunity*. *Infect Immun*. <https://doi.org/10.1128/iai.61.3.1152-1156.1993>.
- Peek, Simon F., Sheila M. Mcguirk, Raymond W. Sweeney, y Kevin J. Cummings. 2018. «Infectious Diseases of the Gastrointestinal Tract». En *Rebhun's Diseases of Dairy Cattle: Third Edition*, 249-356. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-39055-2.00006-1>.
- Pérez, Lucía, Lucía Apezteguía, Cecilia Piñeyrúa, Agustín Dabezies, María N. Bianco, Felipe Schelotto, y Gustavo Varela. 2014. «Síndrome urémico hemolítico con compromiso renal leve debido a una cepa de *Escherichia coli* productora de toxina Shiga [Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC)] O145». *Revista Argentina de Microbiología* 46 (2): 103-6. [https://doi.org/10.1016/S0325-7541\(14\)70056-2](https://doi.org/10.1016/S0325-7541(14)70056-2).

- Persad, Anil K., y Jeffrey T. LeJeune. 2014. «Animal Reservoirs of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*». *Microbiology Spectrum* 2 (4). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ehec-0027-2014>.
- Pettersen, Veronika Kuchařová, Knut Anders Mosevoll, Paul Christoffer Lindemann, y Harald G. Wiker. 2016. «Coordination of metabolism and virulence factors expression of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* purified from blood cultures of patients with sepsis». *Molecular and Cellular Proteomics* 15 (9): 2890-2907. <https://doi.org/10.1074/mcp.M116.060582>.
- Picard, Bertrand, José Sevali Garcia, Stéphanie Gouriou, Patrick Duriez, Naïma Brahim, Edouard Bingen, Jacques Elion, y Erick Denamur. 1999. «The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection?» *Infection and Immunity* 67 (2): 546-553. <https://doi.org/10.1128/iai.67.2.546-553.1999>.
- Poirel, Laurent, Jean-Yves Madec, Agnese Lupo, Anne-Kathrin Schink, Nicolas Kieffer, Patrice Nordmann, y Stefan Schwarz. 2018. «Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli*». En *Antimicrobial Resistance in Bacteria from Livestock and Companion Animals*, 289-316. American Society of Microbiology. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.arba-0026-2017>.
- Prevention, Centers for Disease Control and. s. f. «Reports of Selected *E. coli* Outbreak Investigations | *E. coli* | CDC». Accedido 1 de noviembre de 2020. <https://www.cdc.gov/ecoli/outbreaks.html>.
- Pruimboom-Brees, Ingrid M, Tim W Morgan, Mark R Ackermann, Evelyn D Nystrom, James E Samuel, Nancy A Cornick, y Harley W Moon. 2000. «Cattle lack vascular receptors for *Escherichia coli* O157:H7 Shiga toxins». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (19): 10325-29. <https://doi.org/10.1073/pnas.190329997>.
- Rangel, Josefa M., Phyllis H. Sparling, Collen Crowe, Patricia M. Griffin, y David L. Swerdlow. 2005. «Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks, United States, 1982-2002». *Emerging Infectious Diseases* 11 (4): 603-9. <https://doi.org/10.3201/eid1104.040739>.
- Ribot, Efrain M., M. A. Fair, R. Gautom, D. N. Cameron, S. B. Hunter, B. Swaminathan,

- y Timothy J. Barrett. 2006. «Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of Escherichia coli O157:H7, Salmonella, and Shigella for PulseNet». *Foodborne Pathogens and Disease* 3 (1): 59-67. <https://doi.org/10.1089/fpd.2006.3.59>.
- Rivas, Marta, Elizabeth Miliwebsky, Isabel Chinen, Natalia Deza, y Gerardo A. Leotta. 2006. «Epidemiología del síndrome uremico hemolítico en Argentina. Diagnóstico del agente etiológico, reservorios y vías de transmisión». *Medicina* 66 (SUPPL. 3): 27-32.
- Robicsek, A., J. Strahilevitz, D. F. Sahm, G. A. Jacoby, y D. C. Hooper. 2006. «qnr prevalence in ceftazidime-resistant Enterobacteriaceae isolates from the United States». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50 (8): 2872-74. <https://doi.org/10.1128/AAC.01647-05>.
- Robins-Browne, Roy M., Kathryn E. Holt, Danielle J. Ingle, Dianna M. Hocking, Ji Yang, y Marija Tauschek. 2016. «Are Escherichia coli pathotypes still relevant in the era of whole-genome sequencing?» *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 6 (NOV): 1-9. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00141>.
- Rodríguez-Martínez, José Manuel, Jesús Machuca, María Eliecer Cano, Jorge Calvo, Luis Martínez-Martínez, y Alvaro Pascual. 2016. «Plasmid-mediated quinolone resistance: Two decades on». *Drug Resistance Updates*. Churchill Livingstone. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2016.09.001>.
- Rojas-Lopez, Maricarmen, Ricardo Monterio, Mariagrazia Pizza, Mickaël Desvaux, y Roberto Rosini. 2018. «Intestinal pathogenic Escherichia coli: Insights for vaccine development». *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00440>.
- Ron, Eliora Z. 2006. «Host specificity of septicemic Escherichia coli: Human and avian pathogens». *Current Opinion in Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2005.12.001>.
- Russo, Thomas A., y James R. Johnson. 2003. «Medical and economic impact of extraintestinal infections due to Escherichia coli: Focus on an increasingly important endemic problem». *Microbes and Infection*. Elsevier Masson SAS.

[https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(03\)00049-2](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(03)00049-2).

———. 2004. «Molecular Epidemiology of Extraintestinal Pathogenic Escherichia coli». *EcoSal Plus* 1 (1). <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.8.6.1.4>.

Russo, Thomas A, y James R Johnson. 2000. «Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of Escherichia coli: ExPEC». *Journal of Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.1086/315418>.

Rycke, Jean De, E. A. Gonzalez, J. Blanco, Eric Oswald, Miguel Blanco, y R. Boivin. 1990. «Evidence for two types of cytotoxic necrotizing factor in human and animal clinical isolates of Escherichia coli». *Journal of Clinical Microbiology* 28 (4): 694-99. <https://doi.org/10.1128/jcm.28.4.694-699.1990>.

Sahl, Jason W., Carolyn R. Morris, y David A. Rasko. 2013. «Comparative genomics of pathogenic Escherichia coli». En *Escherichia coli: Pathotypes and Principles of Pathogenesis: Second Edition*, 21-43. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397048-0.00002-4>.

Sapountzis, Panagiotis, Audrey Segura, Mickaël Desvaux, y Evelyne Forano. 2020. «An Overview of the Elusive Passenger in the Gastrointestinal Tract of Cattle: The Shiga Toxin Producing Escherichia coli». *Microorganisms* 8 (6): 877. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8060877>.

Scheutz, Flemming. 2014. «Taxonomy Meets Public Health: The Case of Shiga Toxin-Producing Escherichia coli». *Microbiology Spectrum* 2 (3): 1-15. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ehec-0019-2013>.

Scheutz, Flemming, Louise D. Teel, Lothar Beutin, Denis Piérard, Glenn Buvens, Helge Karch, Alexander Mellmann, et al. 2012. «Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing Stx nomenclature». *Journal of Clinical Microbiology* 50 (9): 2951-63. <https://doi.org/10.1128/JCM.00860-12>.

Schild, Carlos. 2017. «Estimación de la tasa de mortalidad anual de terneros y caracterización de los sistemas de crianza en establecimientos lecheros de Uruguay». <https://bibliotecadigital.fvet.edu.uy:8080/xmlui/handle/123456789/2618>.

- Seija, V, y R Vignoli. 2008. «Principales grupos de antibióticos». En *Temas de bacteriología y Virología Médica*.
- Shridhar, Pragathi B., Chris Siepker, Lance W. Noll, Xiaorong Shi, T. G. Nagaraja, y Jianfa Bai. 2017. «Shiga Toxin Subtypes of Non-O157 Escherichia coli Serogroups Isolated from Cattle Feces». *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 7 (abril). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00121>.
- Smith, James L., Pina M. Fratamico, y Nereus W. Gunther. 2007. «Extraintestinal pathogenic Escherichia coli». *Foodborne Pathogens and Disease*, junio de 2007. <https://doi.org/10.1089/fpd.2007.0087>.
- . 2014. «Shiga toxin-producing escherichia coli». En *Advances in Applied Microbiology*, 86:145-97. Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800262-9.00003-2>.
- Smith, Robert A. 1998. «Impact of Disease on Feedlot Performance: A Review». *Journal of Animal Science*. American Society of Animal Science. <https://doi.org/10.2527/1998.761272x>.
- Sosa, Vanessa, y Pablo Zunino. 2013. «Diversity of Moraxella spp. strains recovered from infectious bovine keratoconjunctivitis cases in Uruguay». *The Journal of Infection in Developing Countries* 7 (11): 819-24. <https://doi.org/10.3855/jidc.3458>.
- Stamm, Ivonne, M. Wuhler, R. Geyer, G. Baljer, y Christian Menge. 2002. «Bovine lymphocytes express functional receptors for Escherichia coli Shiga toxin 1». *Microbial Pathogenesis* 33 (6): 251-64. <https://doi.org/10.1006/mpat.2002.0527>.
- Steyert, Susan R., Jason W. Sahl, Claire M. Fraser, Louise D. Teel, Flemming Scheutz, y David A. Rasko. 2012. «Comparative genomics and stx phage characterization of LEE-negative Shiga toxin-producing Escherichia coli.» *Frontiers in cellular and infection microbiology* 2: 133. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00133>.
- Taschuk, Ryan, y Philip J. Griebel. 2012. «Commensal microbiome effects on mucosal immune system development in the ruminant gastrointestinal tract.» *Animal health research reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases*. <https://doi.org/10.1017/S1466252312000096>.

- Tenaillon, Olivier, David Skurnik, Bertrand Picard, y Erick Denamur. 2010. «The population genetics of commensal *Escherichia coli*». *Nature Reviews Microbiology* 8 (3): 207-17. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2298>.
- Terajima, Jun, Sunao Iyoda, Makoto Ohnishi, y Haruo Watanabe. 2014. «Shiga Toxin (Verotoxin)-Producing *Escherichia coli* in Japan». *Microbiology Spectrum* 2 (5). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ehec-0011-2013>.
- Torres, A. G., P. Redford, R. A. Welch, y S. M. Payne. 2001. «TonB-dependent systems of uropathogenic *Escherichia coli*: Aerobactin and heme transport and TonB are required for virulence in the mouse». *Infection and Immunity* 69 (10): 6179-85. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.10.6179-6185.2001>.
- Tóth, István, y György Schneider. 2015. «The cytolethal distending toxin-IV cdt coding region in an avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) strain shows instability and irregular excision pattern». *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 62 (4): 423-33. <https://doi.org/10.1556/030.62.2015.4.7>.
- Tutenel, A. V., D. Pierard, J. Uradzinski, E. Jozwik, M. Pastuszczyk, J. Van Hende, M. Uyttendaele, et al. 2002. «Isolation and characterization of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 from cattle in Belgium and Poland». *Epidemiology and Infection* 129 (1): 41-47. <https://doi.org/10.1017/S0950268802007197>.
- Uhlin, Bernt E., Jan Oscarsson, y Sun N. Wai. 2014. «Pathogenic *Escherichia coli*; Molecular and cellular Microbiology, chap. 9; Haemolysins». En *Pathogenic Escherichia coli; Molecular and cellular Microbiology*, 161-80. <https://www.caister.com/ecoli>.
- Umpiérrez, Ana. 2016. «Identificación y caracterización de *Escherichia coli* asociada a la Diarrea Neonatal de Terneros en Uruguay». Universidad de la República (Uruguay), Facultad de Ciencias. <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/17187/1/uy24-18213.pdf>.
- Umpiérrez, Ana, Sofía Acquistapace, Sofía Fernández, Martín Oliver, Patricia Acuña, Eduardo Reolón, y Pablo Zunino. 2016. «Prevalence of *Escherichia coli* adhesion-related genes in neonatal calf diarrhea in Uruguay». *Journal of Infection in*

Developing Countries 10 (5): 472-77. <https://doi.org/10.3855/jidc.7102>.

Umpiérrez, Ana, Inés Bado, Martín Oliver, Sofía Acquistapace, Analía Etcheverría, Nora Lía Padola, Rafael Vignoli, y Pablo Zunino. 2017. «Zoonotic Potential and Antibiotic Resistance of *Escherichia coli* in Neonatal Calves in Uruguay». *Microbes and environments* 32 (3): 275-82. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME17046>.

Umpiérrez, Ana, Déborah Ernst, Magalí Fernández, Martín Oliver, María L. Casaux, Rubén D. Caffarena, Carlos Schild, Federico Giannitti, Martín Fraga, y Pablo Zunino. 2020. «Virulence genes of *Escherichia coli* in diarrheic and healthy calves». *Revista Argentina de Microbiología*. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2020.04.004>.

Varela, G, I Chinen, P Gadea, E Miliwebsky, M I Mota, S. González, G González, et al. 2008. «Detección y caracterización de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga a partir de casos clínicos y de alimentos en Uruguay». *Revista Argentina de Microbiología* 40 (2): 93-100.

Versalovic, James, M. Schneider, F. J. De Bruijn, y J. R. Lupski. 1994. «Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction». *Methods in Molecular and Cellular Biology* 5 (1): 25-40. <https://scholars.houstonmethodist.org/en/publications/genomic-fingerprinting-of-bacteria-using-repetitive-sequence-base>.

Vidal, Roberto M., Nayaret L. Chamorro, y Jorge A. Girón. 2016. «Enterotoxigenic *Escherichia coli*». En *Escherichia Coli in the Americas*, 7:1-26. NIH Public Access. https://doi.org/10.1007/978-3-319-45092-6_1.

Vignoli, R, y V Seija. 2008. «Principales Mecanismos de Resistencia antibiótica». En *Temas de bacteriología y Virología Médica*, 649-62. <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/Principalesmecanismosderesistenciaantibiotica.pdf>.

Volkan, Ender, Bradley A. Ford, Jerome S. Pinkner, Karen W. Dodson, Nadine S. Henderson, David G. Thanassi, Gabriel Waksman, y Scott J. Hultgren. 2012. «Domain activities of PapC usher reveal the mechanism of action of an *Escherichia coli* molecular machine». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (24): 9563-68.

<https://doi.org/10.1073/pnas.1207085109>.

WHO, World Health Organization: 2017. «Resistencia a los antimicrobianos». Revista de Investigaciones Agropecuarias. 2017. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antimicrobianos>.

Zhang, Xue Han, Qing Ye, Ya Dong Liu, Bin Li, Renata Ivanek, y Kong Wang He. 2013. «Development of a LAMP assay for rapid detection of different intimin variants of attaching and effacing microbial pathogens». *Journal of Medical Microbiology* 62 (PART 11): 1665-72. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.054551-0>.