



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY



Facultad de Veterinaria  
Universidad de la República  
Uruguay

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

PREVALENCIA DE GENES *STX* Y *ESCHERICHIA COLI* PRODUCTOR DE  
TOXINA SHIGA (STEC) EN CANALES BOVINAS URUGUAYAS

LUCÍA TRUJILLO IGLESIAS

TESIS DE MAESTRÍA EN SALUD ANIMAL

URUGUAY

2021





UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY



Facultad de Veterinaria  
Universidad de la República  
Uruguay

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

PREVALENCIA DE GENES *STX* Y *ESCHERICHIA COLI* PRODUCTOR DE  
TOXINA SHIGA (STEC) EN CANALES BOVINAS URUGUAYAS

LUCÍA TRUJILLO IGLESIAS

---

Gustavo Varela

Director de Tesis

---

Santiago Luzardo

Co- tutor

**INTEGRACION DEL TRIBUNAL DE  
DEFENSA DE TESIS**

**Dra. Cristina López (presidente)**

**Dra. Carolina Fiol (Segundo Miembro)**

**Dra. Lorena Pardo (Tercer Miembro)**

**Fallo del Tribunal:**

**Facultad de Veterinaria**

**Viernes, 4 de marzo de 2022**

# ACTA DEFENSA



## ACTA DE TESIS DE MAESTRÍA

**ORIENTACIÓN:** Salud Animal

**LUGAR Y FECHA DE LA DEFENSA:** PRESENCIAL Y PLATAFORMA ZOOM, Viernes 4/03/2022

**TRIBUNAL:** Cristina López, Carolina Fiol, Lorena Pardo

CI	NOMBRE	CALIFICACIÓN	NOTA
4580432-2	TRUJILLO IGLESIAS, LUCIA	MB, MB, MB	9

### TRIBUNAL

Cristina Lopez

Carolina Fiol

Lorena Pardo

### FIRMA

**NOTA:** La calificación mínima para aprobar la defensa es B.B.B (6)





## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, quisiera agradecerle a mi familia, a mis padres y hermanos que me contuvieron y apoyaron durante todo este proceso, en especial a mi madre por su infinito amor y dedicación.

A mi abuelo, motor y pilar fundamental quien me enseñó la importancia de la dedicación y trabajo.

A mi pequeña sobrina Paz que llegó para enseñarme que lo que se hace con amor está bien hecho.

A mis amigas, por hacerme sonreír y escucharme cada vez que lo necesite.

A mi tutor Gustavo Varela, por ser un compañero durante la elaboración de este trabajo aportándome su conocimiento, calidez e infinita paciencia.

A los funcionarios de INAC e INIA, por la realización del muestro, colaboración y aportes siempre acertados.

A los responsables de las plantas frigoríficas por permitirnos ingresar con absoluta libertad para la toma de muestras.

A Ana Maquieira, Inés Martínez, Paula Mussio y Santiago Ultra por permitirme formar parte de este proyecto y por las horas compartidas de trabajo en el laboratorio

A los funcionarios del Laboratorio de microbiología de LATU, por la ayuda, las risas y charlas.

A Fernando Massa por sus aportes para el análisis estadístico.

A los funcionarios del laboratorio de Bacteriología del Instituto de Higiene, que me ayudaron siempre de manera desinteresada tanto en el análisis estadístico como en el procesamiento de las muestras.

A José Pedro Dragonetti, Gonzalo Chalela, Gonzalo Crosi, Cristina Friss, Carina Galli, Federico Garcia y Santiago Diaz, Compañeros de trabajo y amigos del instituto de investigaciones pesqueras Víctor Bertullo, por su cariño, consejos y colaboración tomándose cada problema como propio.

A Anita Umpierrez y Pablo Zunino, por permitirme hace años ingresara como pasante al laboratorio de Microbiología del IIBCE, donde comencé a formarme.

A la Agencia Nacional de Investigación e Innovación por otorgarme la beca de maestría.

A todo quien me haya cruzado en este camino y supo darme una palabra de aliento,  
Muchas gracias





# INDICE

## CONTENIDO

<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	I
<b>LISTA DE CUADROS Y FIGURAS</b> .....	V
<b>RESUMEN</b> .....	VIII
<b>1. INTRODUCCION</b> .....	1
<b>2. ANTECEDENTES ESPECIFICOS</b> .....	3
<b>2.1 Enfermedades Transmitidas por los Alimentos:</b> .....	3
<b>2.2 Características Generales de Escherichia coli:</b> .....	8
<b>2.3 Escherichia coli productor de toxina Shiga (STEC)</b> .....	13
<b>2.4 Toxina Shiga</b> .....	19
<b>2.5 Mecanismo de acción y patogenia de la toxina Shiga:</b> .....	21
<b>2.6 Reservorio de STEC:</b> .....	25
<b>2.7 Síndrome urémico hemolítico:</b> .....	28
<b>2.8 Medidas para disminuir la exposición a STEC e incidencia de SUH:</b> .....	31
<b>2.9 Producción:</b> .....	32
<b>3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA HIPOTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	35
<b>3.1 Hipótesis</b> .....	36
<b>3.2 Objetivo general:</b> .....	36
<b>3.3 Objetivos específicos:</b> .....	36
<b>4. Materiales y Métodos:</b> .....	37
<b>4.1 Muestreo:</b> .....	37
Las unidades de análisis fueron las medias canales. El tamaño muestral se calculo asumiendo que Uruguay dispone de 12 millones de cabezas de ganado bovino y que la prevalencia de genes <i>stx</i> se encontraría entre un 15- 20% , con intervalo de confianza del 95 % y un error de 3%, estableciéndose de este modo un n= 800.....	37
<b>4.2 Recepción de las muestras:</b> .....	38
<b>4.3 Procesamiento de las muestras:</b> .....	39
<b>4.3.1 Enriquecimiento:</b> .....	39
<b>4.3.2 Primer tamizaje de las muestras:</b> .....	39
<b>4.3.3 Extracción de ADN/ Lisis:</b> .....	39
<b>4.3.4 Reacción en cadena de la Polimerasa:</b> .....	40
<b>4.3.5 Aislamiento</b> .....	40
<b>4.3.6 Extracción de ADN de la Zona de descarga:</b> .....	42

4.3.7 Reacción en cadena de la polimerasa de la Zona de descarga (Segundo tamizaje):.....	42
4.3.8 Electroforesis.....	45
4.3.9. Aislamiento de colonias.....	45
4.3.10 Extracción de ADN de los Pooles.....	46
4.3.11 Reacción en cadena de la polimerasa de los pooles:.....	46
4.3.12 Interpretación de los Resultados / Electroforesis: .....	47
4.3.13 Extracción de ADN de las colonias:.....	47
4.3.14 Reacción en cadena de la Polimerasa: .....	48
4.3.15 Interpretación de los Resultados / Electroforesis: .....	48
4.3.16 Reaislamiento de Colonias stx positivas: .....	48
4.3.17 Identificación Bioquímica:.....	48
4.4 Crio preservación de las cepas Aisladas: .....	49
4.5 Análisis estadístico.....	49
5. Resultados: .....	50
5.1 Análisis descriptivos del Muestreo: .....	50
5.1.2 Distribución de las Muestras:.....	50
5.2 Análisis inferencial .....	52
5.2.1 Asociación de factores a la presencia de genes stx en caldo .....	53
5.2.2 Presencia de genes stx a nivel de zona de descarga: .....	55
5.2.3 Colonias STEC recuperadas .....	56
6.Discusión .....	57
7.Conclusiones .....	62
8. Implicancias.....	62
8. Bibliografía.....	63

## **LISTA DE CUADROS Y FIGURAS**

Cuadro I. Síntomas, microorganismos y toxinas responsables de las principales enfermedades transmitidas por los alimentos

Cuadro II. Patotipos de *E. coli* patógenos intestinales definidos sobre la base de la presencia de genes de virulencia específicos, factores de virulencia, tipo de enfermedad y síntomas producidos.

Cuadro III. Cebadores utilizados en la reacción de PCR para la identificación de genes *stx* y *eae* en cepas *E. coli*,

Cuadro IIII. Programa de PCR utilizado para la amplificación del ADN, se detallan números de ciclos y temperaturas de hibridación correspondientes

Cuadro V. Distribución de caldos positivos y negativos según tipo de frigorífico

Cuadro VI. Resultados del análisis multivariado

Cuadro VII. Número y porcentaje de descargas positivas a genes *stx* de manera individual y en combinación

Figura 1. Visión general de la adquisición y pérdida de genes en diferentes Patotipos de *E. coli*

Figura 2. Evolución cronológica de la infección por STEC

Figura 3. Organización genética de la isla de patogenicidad LEE

Figura 4. Posibles rutas de translocación de Stx a través del epitelio intestinal humano

Figura 5. Número de casos y tasas notificadas de SUH en Argentina en menores de 5 años durante el periodo 2014- 2019

Figura 6. Porcentajes de notificaciones del portal Rasff asociadas a diferentes alimentos

Figura 7. Esponja empleada para la toma de muestra de una media canal, sumergida en medio mTSB.

Figura 8. Aspecto de colonias de coliformes, *E. coli* O157 y *Proteus* en medio cromogénico

Figura 9. Colonias de *E.coli* sembradas en medio MacConkey

Figura 10. Colonias de *E.coli* sembradas en medio Levine

Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR de la zona de descarga

Figura 12. Cincuenta colonias de *E. coli* asiladas en medio MacConkey

Figura 13. Distribución de la faena nacional en función de la categoría animal

Figura 14. Distribución de las muestras en función de la categoría animal

Figura 15. Distribución de la categoría animal de las medias canales en Frigoríficos de abasto y exportación.

Figura 16. Distribución de las medias canales en función de la estacionalidad.

Figura 17. Distribución de caldos positivos y negativos según tipo de frigorífico



## RESUMEN

La presencia de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga (STEC) o genes *stx* en alimentos cárnicos genera pérdidas económicas en esta cadena productiva. Uruguay no cuenta con información sobre la prevalencia de STEC o genes *stx* a nivel de canales bovinas listas para procesar, ni sobre factores de la producción que pueden influir sobre la misma. El objetivo del trabajo fue conocer la prevalencia de genes *stx* y STEC en canales bovinas y sus variaciones. Entre agosto de 2018 y junio de 2020 se analizaron 800 medias canales. El muestreo fue aleatorio, estratificado y representativo de la faena nacional en cuanto al tipo de animal. Las medias canales se seleccionaron aleatoriamente. Las muestras fueron obtenidas mediante el pasaje de una esponja esteril por la totalidad de la media canal y luego fueron analizadas mediante RT-PCR, para identificar genes *stx* y *eae* (*eae* codifica una proteína de membrana externa llamada intimina que permite la adhesión íntima al enterocito). Sobre las muestras positivas para ambos genes se realizó RT-PCR para la detección de los genes *rfb* O157 y *fliC* H7 que codifican para O157 y H7. En aquellas positivas para ambos se realizó separación inmunomagnética para O157 y luego siembra en agar cromogénico y MacConkey sorbitol con telurito y cefixime. Las colonias sospechosas fueron aglutinadas con kit comercial para confirmar la presencia del antígeno O157. Todas las muestras positivas para genes *stx* se sembraron para obtener el mayor número de colonias aisladas. Hasta 50 colonias por muestra positiva fueron estudiadas por PCR para detectar los genes *stx*<sub>1/2</sub> y *eae*. Las colonias sospechosas de STEC se congelaron a -80°C para estudios posteriores. Para analizar los resultados se realizaron pruebas de Chi<sup>2</sup>, test exacto de Fisher y regresión logística. La prevalencia de genes *stx* (solos o asociados a *eae*) fue del 22,4 % (IC 95%= 19,5- 25,3), mientras que la prevalencia de STEC fue del 18,5% (tomando como positivas aquellas muestras donde se logró obtener señal positiva en la zona de descarga para genes *stx*<sub>1</sub>, *stx*<sub>2</sub>) (IC95%=16-21). Solo en 2/800 se logró recuperar STEC O157:H7. Se determinó que época del sacrificio, tipo de faena y alimentación animal previa no están asociadas con la prevalencia de genes *stx*. La categoría animal, establecimiento de faena y presencia de pelos visibles se asociaron con mayor prevalencia de genes *stx*. En novillos y vaquillonas la prevalencia fue mayor que en el resto, representando un 43% y 34,4%, respectivamente. En frigoríficos de abasto la prevalencia de *stx* fue 6,7 veces mayor que en exportadores. El análisis multivariado mostró que las variables que inciden significativamente sobre la positividad para genes *stx* fueron: tipo de frigorífico (abasto), tipo de animal (vaquillona) y presencia de pelos visibles. El porcentaje de detección de genes *stx* (22,4%) fue similar al encontrado en plantas argentinas con normas HACCP. Una cifra similar (27%) fue reportada en establecimientos de exportación en Irlanda. Los resultados indican que sería aconsejable aplicar medidas de mitigación de la contaminación microbiana en establecimientos de abasto y validar las medidas declaradas en establecimientos exportadores.

## SUMMARY

The presence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) or *stx* genes in meat food generates economic losses in this production chain. Uruguay does not have information about the prevalence of STEC or *stx* genes in ready-to-process bovine carcasses, nor on factors that may influence their variation. The aim of the work was to know the prevalence of *stx* genes and STEC in bovine carcasses and their variations. Between August 2018 and June 2020, 800 carcasses were analyzed.

The sampling was random, stratified and representative of the national slaughter in terms of the number and animal type. The carcasses were randomly selected.

Samples were obtained by passing a sterile sponge over the entire carcass surface and then analyzed by RT-PCR to identify *stx* and *eae* coding genes (*eae* gene encodes an outer membrane protein called intimin that allows intimate adhesion to the enterocyte). On positive samples for both genes detection of the *rfb* O157 and *fliC* H7 genes that code for O157 and H7 was performed by RT-PCR. In those positive, immunomagnetic separation was performed for O157 and then inoculated on chromogenic agar and MacConkey sorbitol with tellurite and cefixime. Suspicious colonies were agglutinated with a commercial kit to confirm the presence of the O157 antigen. All samples positive for *stx* genes were seeded to obtain the highest number of isolated colonies. Up to 50 colonies per positive sample were studied by PCR to detect the *stx*<sub>1/2</sub> and *eae* genes. Suspicious STEC colonies were frozen at -80 °C for further studies. Chi<sup>2</sup> tests, Fisher's exact test and logistic regression were performed to analyze the results. The *stx* prevalence (alone or associated with *eae*) was 22,4% (95% CI = 19.5-25.3), while the prevalence of STEC was 18,5% (taking those samples as positive where it was possible to obtain a positive signal in the discharge zone for genes *stx*<sub>1/2</sub>) (95% CI = 16-21). Only 2 recovered STEC belonged to O157:H7 serotype. It was determined that the time of slaughter, type of slaughter and previous animal feeding are not associated with the prevalence of *stx* genes. Animal category, slaughter establishment and presence of visible hairs were associated with a higher prevalence of *stx* genes.

In steers and heifers the prevalence was higher than in the rest, representing 43% and 34,4%, respectively. In local supply abattoirs the *stx* prevalence was 6,7 times higher than in exporters. The multivariate analysis showed that the variables that significantly affect positivity for *stx* genes were: abattoir type (local supply), animal category (heifer) and presence of visible hairs. The percentage of detection of *stx* genes (22,4%) was similar to that found in argentinian plants with HACCP standards. A similar figure (27%) was reported in export establishments in Ireland. The results indicate that it would be advisable to apply measures to mitigate microbial contamination in local supply abattoirs and to validate the measures declared in export establishments.



# 1. INTRODUCCION

Las cepas de *Escherichia coli* productoras de toxina Shiga (STEC) son un grupo heterogéneo de bacterias patógenas que cuentan con la habilidad de producir potentes citotoxinas, codificadas por los genes fágicos *stx* y letales para las células eucariotas. Estos genes definen el patotipo de STEC y son marcadores útiles para identificarlo por diferentes procedimientos de laboratorio (Caprioli, Morabito, Brugere y Oswald, 2005; Joseph, Kurkdjian, Rafat y Herting, 2020).

Estos microorganismos son reconocidos agentes zoonóticos. En Europa, entre 2014 y 2018, las infecciones por STEC se ubicaron en el tercer lugar de frecuencia dentro de las zoonosis denunciadas. Integran el microbiota intestinal de diversas especies animales, incluyendo los de compañía y aquellos destinados al consumo humano. Los rumiantes son considerados su reservorio natural siendo estos, en especial los bovinos de carne o leche, uno de los puntos más importante de ingreso a la cadena alimentaria (Caprioli et al., 2005; Food & Authority, 2019; Rodríguez-Angeles, 2002).

La ingestión de agua o alimentos contaminados con STEC puede generar en los consumidores cuadros gastrointestinales leves, con diarrea acuosa; procesos más severos como diarrea sanguinolenta o colitis hemorrágica (CH), o incluso complicaciones graves como Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) o Púrpura Trombótica Trombocitopénica (PTT) (Gyles, 2007; Margall, Domínguez, Prats y Salleras, 1997).

En Uruguay ocurren entre 10-15 casos de SUH por año, afectando sobre todo a niños menores de 5 años. En los casos en los que se logró recuperar STEC, predominaron los cultivos no-O157 y en ningún caso se pudo determinar de forma contundente el origen y vehículo del agente (Schelotto y Varela, 2016).

STEC es considerado uno de los principales agentes causantes de toxiinfecciones alimentarias (TIAs) junto a bacterias de los géneros *Salmonella*, *Campylobacter*, *Staphylococcus*, *Clostridium* y *Listeria*, entre otros. Este tipo de enfermedades constituyen un problema de Salud para las poblaciones más desfavorecidas, debido entre otros factores, a la dificultad que tienen para acceder a fuentes de agua potable, alimentos inocuos, electricidad para su adecuada cocción y conservación, y también para alcanzar los servicios de Salud, etc. (Food & Authority, 2019) .

La inocuidad juega un rol clave para la Salud y también impacta en la comercialización de estos alimentos. Representa un valor agregado sumado a su aporte nutricional. La presencia de STEC a nivel de estos genera grandes pérdidas económicas ya que su presencia o la de los genes *stx* es motivo de rechazo en los diferentes mercados compradores.

Si bien STEC puede estar presente en distintos alimentos, se asocia estrechamente con los productos cárnicos de origen bovino, ya que durante el proceso de faena las canales pueden contaminarse con bacterias provenientes del contenido intestinal del propio animal o de otros por contaminación cruzada, incluyendo cepas STEC (Kim, Lee y Kim, 2020).

Uruguay es un país de tradición agropecuaria siendo la producción cárnica una de sus principales fuentes de divisas debido tanto al consumo local como a su exportación (Ceres, 2020).

Alrededor del 80% de la producción cárnica doméstica y subproductos se destinó a la exportación, representa el 4% del PBI nacional (Ceres, 2020).

Es por este motivo que asegurar la inocuidad de los productos cárnicos es de gran relevancia sanitaria y económica para consumidores y vendedores.

Nuestro país no cuenta con información sobre la prevalencia de STEC ni de los genes *stx* a nivel de las canales bovinas prontas para procesar, ni sobre factores que pueden influir en su prevalencia.

Determinar su prevalencia, así como evaluar algunos factores capaces de incidir en ella, permitirá conocer la situación nacional en torno a esta problemática e implementar estrategias específicas tendientes a reducir o eliminar su presencia en canales bovinas y por lo tanto disminuir el impacto sanitario y las pérdidas económicas asociados a los rechazos que su presencia determina.

## **2. ANTECEDENTES ESPECIFICOS**

### **2.1 Enfermedades Transmitidas por los Alimentos:**

Las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA) son consecuencia de la ingestión de alimentos y/o bebidas contaminadas con microorganismos potencialmente patógenos, sustancias químicas perjudiciales o agentes físicos nocivos durante su elaboración, almacenamiento, conservación y distribución, afectando la salud del consumidor en forma aguda o crónica, de manera individual o colectiva. (Flores y Herrera, 2005).

Si bien las ETAs son de gran relevancia en la actualidad, el vínculo que existe entre el consumo de alimentos y el desarrollo de enfermedades fue descrito 460 años antes de Cristo por Hipócrates, quien determinó que existía una fuerte conexión entre el desarrollo de enfermedades en los seres humanos y los alimentos consumidos por estos (Hutt, 1984).

Engloban un amplio abanico de enfermedades y constituyen un problema de salud pública que cada vez toma mayor trascendencia a nivel mundial. Dentro de las ETAs existe un conjunto de enfermedades denominadas Toxiinfecciones alimentarias (TIAs) (Food & Authority, 2019).

Las TIAs son el resultado de la ingestión de alimentos contaminados con agentes biológicos tales como virus, bacteria, parásitos o con sus toxinas. (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, FAO, 2019). En este caso los alimentos no solo actúan como vehículo de estos agentes, sino que también permiten la multiplicación microbiana y la liberación de sus toxinas (Food & Authority, 2019).

En el año 2015 en la Unión Europea se notificaron 4.362 brotes a causa de enfermedades transmitidas por los alimentos y agua. Estos brotes provocaron 45874 casos de enfermedad, 3892 hospitalizaciones y 17 muertes. (Food & Authority, 2019).

El impacto generado por estas enfermedades difiere notablemente entre países desarrollados y el resto. Esto se debe fundamentalmente a diferencias en el acceso a alimentos inocuos, oferta y calidad de los sistemas de salud, calidad de los alimentos y grado de exposición de la población, entre otros factores (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control, 2019).

Los alimentos frecuentemente implicados son de origen animal, huevos, pescados, queso, leche, crustáceos y carne del tipo vacuna, suina o aviar (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control, 2019).

Los síntomas más frecuentes que se presentan son de tipo gastrointestinales como vómitos y diarrea con o sin sangre. Sin embargo, es posible observar una gran diversidad de síntomas y cuadros clínicos dependiendo del agente presente en el alimento, pudiendo aparecer en ocasiones choque séptico, hepatitis (Flores & Herrera, 2005), y cuadros neurológicos severos entre otros (Organización Panamericana de la Salud, n.d.).

Su resolución puede ocurrir en pocos días sin desarrollar grandes complicaciones o tener graves consecuencias para la salud debido al desarrollo de secuelas a largo plazo incluso la muerte (FAO, 2019).

El resultado final se ve influenciado por el estado de salud del consumidos, desarrollándose cuadros más severos en niños, ancianos, mujeres embarazadas o enfermos con patologías de base (Organización Panamericana de la Salud, n.d.).

Es necesario para el desarrollo de una TIA la presencia de patógenos o sus toxinas en el alimento ingerido en cantidades necesarias para que las barreras defensivas del individuo sea sobrepasada y se desarrolle una infección, intoxicación o toxico infección respectivamente (Organización Panamericana de la Salud, n.d.).

Las toxiinfecciones alimentarias pueden ser clasificadas de acuerdo al mecanismo patogénico como verdaderas infecciones cuando la enfermedad resulta de la ingestión de alimentos que cuentan con patógenos vivos que luego se multiplican en el huésped causando daño, o como intoxicaciones o envenenamiento alimentario cuando el alimento consumido contienen toxinas producidas por microorganismos que afecten directamente la salud sin necesidad de multiplicarse en el hospedero, presentando un periodo de incubación menor al presente en las infecciones (Organización Panamericana de la Salud, n.d.).

Hasta la fecha se han descrito más de 250 ETAs, la gran mayoría son del tipo infecciosas ocasionadas por distintos agentes (Olea, Díaz, Fuentes, Vaquero y García, 2012).

En el cuadro I se detallan los síntomas, microorganismos y toxinas responsables de las principales enfermedades transmitidas por los alimentos.

## Cuadro I. Síntomas, microorganismos y toxinas responsables de las principales enfermedades transmitidas por los alimentos (Bintsis, 2017)

Tiempo aproximado de aparición de los síntomas	Síntomas predominantes	Organismos o toxinas asociadas
1-7 h, promedio 2-4	Náuseas, vómito, diarrea, dolor abdominal, postración	<i>Staphylococcus aureus</i> y sus enterotoxinas
8-16 h (2-4 cuando hay vómito predominante)	vómito o diarrea, dependiendo el tipo de toxina actuante, calambres abdominales, náuseas	<i>Bacillus cereus</i> (toxinas eméticas)
12-48 h	Náuseas, vómito, diarrea acuosa no sanguinolenta, deshidratación	<i>Norovirus</i>
2-36 h (6-12 h promedio)	Calambres abdominales, diarrea, diarrea putrefacta ( <i>CL. perfringens</i> ), deshidratación	<i>Clostridium perfringens</i>
6-96 h (generalmente 1-3 días)	Fiebre, calambres abdominales, diarrea, vómito, dolor de cabeza	<i>Salmonella</i> spp., <i>Shigella</i> spp., <i>E.coli</i>
6 h a 5 días	Calambre abdominales, diarrea, vómito, fiebre, malestar, náuseas, dolor de cabeza, deshidratación	<i>Vibrio cholerae</i> (O1 y no-O1), <i>Vibrio parahemolítico</i>
1-10 Días (promedio 3-4 días)	Diarrea frecuentemente sanguinolenta, dolor abdominal, náuseas, vómito, malestar, fiebre (poco frecuente en <i>E.coli</i> O157: H7)	<i>E.coli enterohemorrágica</i> , <i>Cambylobacter</i> spp.
3-5 días	Fiebre, diarrea, diarrea acuosa no inflamatoria	<i>Rotavirus</i> , <i>Astrovirus</i> , <i>Adenovirus enterico</i>
3-7 días	Fiebre, diarrea, dolor abdominal	<i>Yersinia enterocolitica</i>
De una a varias semanas	Dolor abdominal, diarrea, constipación, dolor de cabeza, somnolencia, úlceras, variable-frecuentemente asintomática	<i>Entamoeba Histolytica</i>
3-6 meses	Nerviosismo, insomnio, anorexia, dolor por hambre, pérdida de peso, dolor abdominal, gastroenteritis ocasionalmente	<i>Taenia saginata</i> , <i>Taenia solium</i>
2 h - 6 días, generalmente 12-36 h	Vértigo, visión doble o borrosa, dificultad para deglutir, boca seca, debilidad, parálisis respiratoria	<i>Clostridium botulinum</i> y sus neurotoxinas
4- 28 días	Gastroenteritis, fiebre, edema ocular, sudoración, dolor muscular, escalofríos, postración, respiración dificultosa	<i>Trichinella spiralis</i>
7-28 días	Malestar, dolor de cabeza, fiebre, tos, náuseas, vómito, constipación, dolor abdominal, escalofríos, heces sanguinolentas.	<i>Salmonella typhi</i>
10-13 días	Fiebre, dolor de cabeza, mialgia, picazón.	<i>Toxoplasma gondii</i>
Períodos variables	Fiebre, escalofríos, dolor de cabeza, postración, nódulos hipoglosos inflamados, malestar.	<i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Campylobacter jejuni</i>

Entre las bacterias comúnmente reconocidas como causantes de ETAs se encuentran las especies del género *Campylobacter*, *Salmonella* y *Listeria*, así como los diferentes patotipos de *E. coli* (FAO, 2019; Olea et al., 2012).

Estos microorganismos son capaces de generar alto impacto en la salud y desarrollar graves secuelas o discapacidades en la población, entre las más destacadas se puede mencionar el síndrome de Guillain-Barré asociado al consumo de alimentos contaminados con *Campylobacter*, Síndrome Urémico Hemolítico a causa de ciertos serotipos de STEC, aborto y meningitis debido a la

presencia de *Listeria monocytogenes*, artritis séptica luego de la infección por *Salmonella*, entre otras (Altekruse, Cohen y Swerdlow, 1997).

Los alimentos pueden contaminarse durante las diferentes etapas del proceso de elaboración, desde la producción primaria hasta el consumo (“de la granja a la mesa”) pudiendo deberse a la contaminación ambiental por el agua utilizada para riego o lavado, suelo y aire (FAO, 2019; Rodríguez Torrens et al., 2015). La falta de conocimientos sobre buenas prácticas de manufactura por parte de quienes preparan alimentos tanto a nivel comercial como a nivel familiar también contribuye a que esto suceda (Kopper, Calderón, Schneider, Domínguezby Gutiérrez 2009).

Según la Organización Mundial de la Salud los países en vías de desarrollo son los más afectados por estas enfermedades, si bien es una importante carga de enfermedad a nivel mundial, representan la principal causa de enfermedad y muerte en grupos sociales de más bajos recursos (Kopper et al., 2009; Olea et al., 2012). El acceso a alimentos de bajo costo, por lo general de calidad e inocuidad dudosa, la falta de electricidad para la correcta conservación de los alimentos, la ausencia de fuentes de energía para la realización de una cocción adecuada, la dificultad para acceder al agua potable, son algunos de los principales motivos por los que se ve afectado este estrato económico (Olea et al., 2012).

Los costos asociados al uso de servicios de salud, la disminución de la productividad y los gastos asociados al monitoreo e implementación de políticas de inocuidad son algunas de las consecuencias de las TIAs en países desarrollados (Olea et al., 2012).

Se estima que la incidencia de casos de diarreas anuales a nivel mundial según la organización mundial de la salud es de 1500 millones de los cuales el 70% corresponde a la ingesta de alimentos contaminados (Olea et al., 2012).

En el año 2015 se determinó que la carga mundial de enfermedades transmitidas por los alimentos alcanzaba los 600 millones de casos generando una pérdida de 33 millones de años de vida y 420000 muertes anuales teniendo una mayor incidencia en la población directamente en los grupos más vulnerables como niños, ancianos y personas inmunodeprimidas (Olea et al., 2012).

Los cambios en los hábitos alimenticios, la elaboración de productos con largos procesos de fabricación, el aumento demográfico, así como el consumo de comidas rápidas prontas, crudas o cocidas que solo requieren calentamiento previo, son algunos los factores que contribuyen al incremento de las ETAs (Altekruse et al., 1997).

Otro de los problemas asociado a las TIAs es el uso terapéutico de antibióticos tanto en humanos como animales, o como promotor del crecimiento en producción animal. Esta situación crea una presión de selección que favorece la supervivencia de cepas de microorganismos resistentes, capaces de contaminar los alimentos

derivados de estos o contaminarlos con sus heces, diseminándose ampliamente (Altekruse; et al, 1997).

Esta adaptación de los microorganismos puede deberse a múltiples factores entre estos, la administración de antibióticos en dosis subterapéuticas actuando como promotores del crecimiento en animales y a la resistencia natural propia de algunos patógenos (Hassan, Farooqui, Khan, Yahya y Kazmi, 2010).

La farmacorresistencia de estos microorganismos tiene una incidencia directa en el número de casos clínicos y aparición de enfermedades resistentes ya que esta les permite sobrevivir en condiciones poco favorables del entorno como puede ser la superficie de elaboración favoreciendo de esta manera la diseminación al alimento (Hassan et al., 2010).

Los cambios en el comercio y un aumento del desplazamiento de la población generan una mayor distribución de estos microorganismos (FAO, 2019).

Las ETAs, lejos de ser un problema del pasado, se han convertido en un problema emergente. Esta problemática tiene un alto impacto socioeconómico asociados a los costos de hospitalización, vigilancia, tratamientos médicos, disminución de mano de obra, pérdida de mercados, confianza del consumidor y obstáculos a nivel comercial (FAO, 2019).

Hoy en día la disponibilidad de alimentos inocuos para el consumidor se ha vuelto una tarea engorrosa, la globalización de los mercados y la complejidad de la cadena alimentaria hacen que se deba hacer foco tanto en la prevención como en la vigilancia para evitar las consecuencias negativas ocasionadas por las ETAs (Kopper et al., 2009).

## 2.2 Características Generales de *Escherichia coli*:

*Escherichia coli* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, este es el grupo más grande y heterogéneo de bacilos Gram negativos de importancia clínica (Murray, Rosenthal y Pfaller, 2019).

Las enterobacterias son microorganismos ubicuos que se encuentran de forma universal en el suelo, agua y vegetación. Forman parte del microbiota intestinal de muchos animales, incluidos los seres humanos (Murray et al., 2019).

Por otra parte, algunos microorganismos pertenecientes a esta familia se asocian a enfermedades clásicas en los seres humanos como *Salmonella Typhi*, *Shigella dysenteriae* y *Yersinia pesitis*, mientras que otros como *Proteus mirabilis* y *Escherichia coli* forman parte de la microbiota intestinal y pueden producir eventualmente infecciones de tipo oportunistas (Murray et al., 2019).

*E. coli* fue aislada por primera vez a partir de heces infantiles en el año 1885 por el pediatra alemán *Theodore Escherich*, quien caracterizó a la bacteria como varillas cortas y delgadas, denominándola *Bacterium Coli Comunne* (la bacteria común del colon) para señalar su presencia en el intestino de individuos sanos (Fiallos López, Enriquez y Navarro Ocaña, 2018), años más tarde fue nombrada de manera definitiva como *Escherichia coli* en honor a su descubridor (Croxen et al., 2013)

Es considerada un microorganismo comensal del tracto gastrointestinal de los animales de sangre caliente (Di Pillo y Sotomayor, 2017). Permanece sin causar enfermedad mientras que no se modifiquen las condiciones de su hábitat, ya que inclusive las cepas comensales son capaces de comportarse de manera nociva y producir daño cuando el huésped se encuentra inmunodeprimido o se pierde la integridad de la barrera intestinal permitiendo que accedan a la cavidad peritoneal (Croxen et al., 2013; Gyles, 2007; Russo y Johnson, 2000) .

Cabe destacar que dentro del grupo de las *E. coli* también podemos encontrar cepas patógenas definidas. Las mismas mediante mecanismos de pérdida y ganancia de genes a partir de cepas comensales consiguieron convertirse en patógenos con gran diversidad y altamente adaptado (Figura 1) (Croxen et al., 2013).

Las cepas patógenas, que habitualmente no integran la microbiota intestinal, han adquirido genes que le confieren la capacidad de afectar la salud del hombre, dentro estos se encuentran los genes que codifican la síntesis de varios atributos de virulencia incluidas diferentes toxinas y genes de resistencia a antibióticos. Generan enfermedad a dosis infectiva baja, presentando alta mortalidad y morbilidad a nivel mundial por lo que representan un importante problema de salud pública (Farfán-García, Ariza-Rojas, Vargas-Cadenas y Vargas-Remolina, 2016; Koutsoumanis et al., 2020).



Esta adaptación de los microorganismos puede deberse a múltiples factores entre estos, la administración de antibióticos en dosis subterapéuticas actuando como promotores del crecimiento en animales y a la resistencia natural propia de algunos patógenos (Croxen et al., 2013).

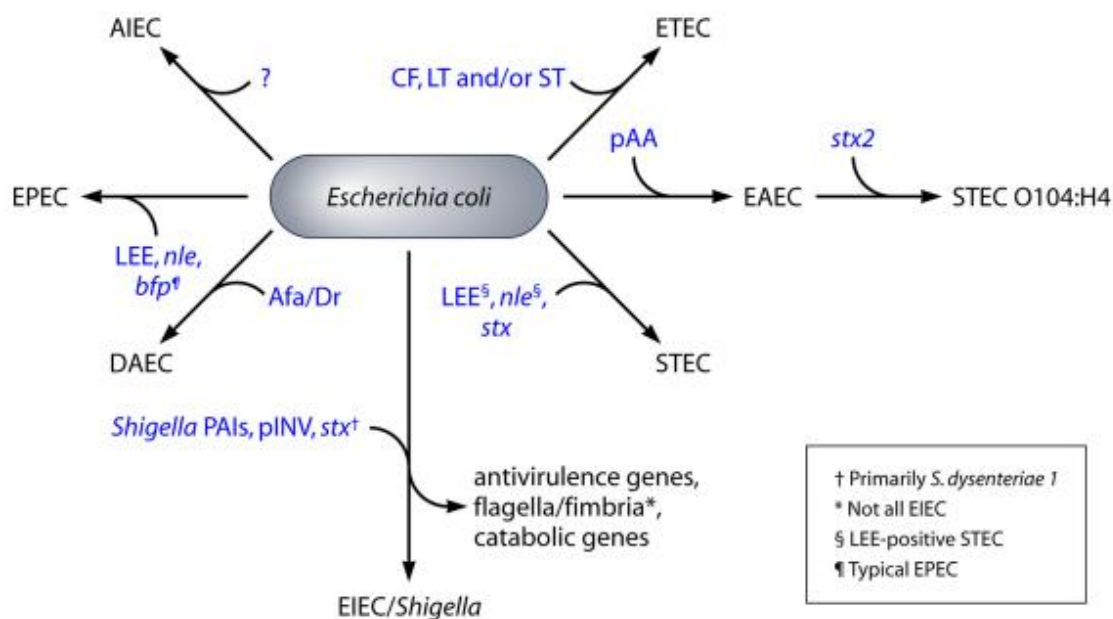


Figura 1. Visión general de la adquisición y pérdida de genes en diferentes patotipos de *E. coli*. Se pueden observar como una cepa comensal adquiere genes adicionales vía fagos, plásmidos o segmentos de ADN. En algunos casos la pérdida de ciertos genes aumenta la virulencia de la cepa (Croxen et al., 2013).

Este microorganismo es uno de los más estudiados en las últimas diez décadas y probablemente el más conocido, tanto a nivel ambiental, humano y alimentario. (Croxen et al., 2013).

A nivel alimentario la ausencia de *E. coli* es indicador de buenas prácticas higiénico-sanitarias en la elaboración de alimentos. Recuentos superiores a 100 UFC/g o su simple presencia sugieren contaminación fecal con el consiguiente riesgo de que estén presentes cepas patógenas (Biaggini, 2007).

La presencia de *E. coli* en alimentos o el agua se da por la contaminación con heces de seres humanos o animales (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control, 2019).

A menudo la contaminación de los alimentos de origen animal se produce durante el sacrificio y su procesamiento. El uso de estiércol de ganado u otros animales como fertilizante para cultivos agrícolas también puede contaminar los productos

y el agua de riego (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control, 2019).

Este microorganismo es capaz de sobrevivir durante largos períodos en el medio ambiente, pudiendo proliferar en vegetales y otros alimentos como frutas, y hortalizas (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control, 2019).

Desde el punto de vista microbiológico se considera una bacteria Gram negativa, con morfología bacilar. Se caracterizan por ser no formador de esporas, anaerobio facultativo y contar con la presencia de flagelos periticos en las cepas móviles (Biaggini, 2007; Murray et al., 2019).

Nutricionalmente son considerados no exigentes al ser capaces de desarrollarse en medios pobres (Biaggini, 2007; Murray et al., 2019).

Son aislados de la materia fecal de manera relativamente sencilla, caracterizándose por ser bioquímicamente organismos indol positivos, así como oxidasa, citrato y urea negativos (Biaggini, 2007; Murray et al., 2019).

Cuentan con la capacidad de reducir los nitratos a nitritos y en general fermentan la lactosa, pudiendo evidenciarse este último a través de la coloración rosada que adquieren las colonias cuando se desarrollan en medios de cultivo que contienen este carbohidrato e indicador de pH óptimo (Biaggini, 2007; Murray et al., 2019).

Es capaz de desarrollarse en un amplio rango de temperatura y pH, confiriéndole estas condiciones la capacidad de sobrevivir en el medio ambiente durante periodos prolongados de tiempo. Su temperatura optima de crecimiento oscila entre los 35 - 40°C con un pH de 6 a 7 pudiendo desarrollarse de igual manera entre los 7 y 46°C con un pH de 4,4 -10 (Farrokh et al., 2013).

Esta bacteria coloniza el tracto gastro intestinal tanto de humanos como animales horas después del nacimiento a partir del medio ambiental y del microbiota materno coexistiendo en condiciones de salud y beneficio mutuo (Kaper et al., 2004; Margall et al., 1997).

Este acontecimiento posiblemente empiece durante el parto ya que las cepas presentes en neonatos son serológicamente idénticas a las maternas (Kaper et al., 2004; Margall et al., 1997).

Es considerado como el anaerobio facultativo más abundante a nivel intestinal, alojándose principalmente en la porción inferior del mismo (Farrokh et al., 2013; Margall et al., 1997)

Contribuyen al correcto funcionamiento del aparato digestivo, pudiendo llegar a coexistir hasta diez serotipos diferentes a nivel intestinal colaborando con la síntesis

de vitaminas como la B y K (Algorta y Schelotto, 2008; Burkholderia y Mcveigh, 1942; Murray et al., 2019).

La población de cepas inofensivas conforma un gran reservorio a partir del cual las cepas patogénicas son capaces de surgir continuamente a partir de un ancestro común mediante la pérdida de genes o ganancia de elementos génicos móviles (Figura 1) como plásmidos, islas de patogenicidad, integrones, bacteriófagos y transposones conteniendo tanto genes de virulencia como de aptitud (Figura 2.) (Croxen et al., 2013; Fiallos López et al., 2018).

La magnitud de su genoma puede variar en un millón de bases entre cepas comensales y variantes patogénicas (Croxen et al., 2013). Se ha demostrado que de entre los 4200 a 5000 genes que conforman este organismo menos de 200 son conservados (Genoma central o core genome), lo que denota que su capacidad patogénica está vinculada a la flexibilidad de su genoma tanto para incorporar o eliminar material genético en puntos calientes (Croxen et al., 2013).

Su genoma presenta una longitud promedio de 5,171 MB, identificándose hasta entonces 5351 genomas completos (Bintsis, 2017).

Según los efectos nocivos que ejerce este agente a nivel del hospedador se clasifican como cepas patógenas extraintestinales si generan lesión fuera del ambiente intestinal ya sea tracto urinario, genital, torrente sanguíneo, y sistema nervioso central, o patógenos diarreogénicos desarrollando cuadros gastrointestinales (Croxen et al., 2013).

A diferencia de las cepas comensales, las cepas de *E. coli* que producen daño a nivel intestinal rara vez se encuentran en el tubo digestivo de los anfitriones sanos (Farrokh et al., 2013).

Sin duda existen gran variedad de microorganismos, capaces de generar cuadros gastrointestinales, dentro de los cuales se destacan virus y bacterias, no obstante, las cepas diarreogénicas de *E. coli* constituyen los mayores contribuyentes en la génesis de diarreas a nivel mundial (Croxen et al., 2013).

Es de alto impacto en la salud a causa de su habilidad de enfermar a dosis infectivas bajas, ocasionando brotes tanto en países desarrollados como subdesarrollados siendo los anfitriones más susceptibles, ancianos, niños pequeños, neonatos e inmunodeprimidos (Farrokh et al., 2013; Murray et al., 2019). En la actualidad se han identificado siete categorías o patotipos de cepas diarreogénicas, (cuadro II) basándose para su clasificación en los efectos que produce en la salud y los factores de virulencia con los que cuenta (Croxen et al., 2013; Russo & Johnson, 2000). Conforme estos criterios se pueden identificar los siguientes patotipos: enterotoxigénico, enteroagregativo, enteropatogenico típico y atípico, enteroinvasivo, de adhesión difusa, invasiva adherente y productor de toxina Shiga,

asimismo este último cuenta con dos variantes las STEC- LEE positivas y LEE negativas (Koutsoumanis et al., 2020).

Otro de los criterios clásicos empleados para su clasificación e identificación se basa en el estudio de sus características antigénicas. Serológicamente se han identificado más de 180 serogrupos según las características de sus lipopolisacáridos y en serotipos a través de la combinación de antígenos de superficie, somático (O), flagelares (H) y capsulares (K) (Di Pillo & Sotomayor, 2017). Cabe destacar que la clasificación serológica complementa la anteriormente mencionada permitiendo identificar las cepas causantes de brotes.

Cuadro II. Patotipos de *E. coli* patógenos intestinales definidos sobre la base de la presencia de genes de virulencia específicos, factores de virulencia, sitio de colonización, tipo de enfermedad y síntomas producidos. Tabla adaptada de (Koutsoumanis et al., 2020).

Patotipo	Adhesión	Genes y factores de virulencia presentes	Sitio de Colonización	Características de virulencia	Síntomas/ Enfermedad
<i>E. coli</i> productor de toxina Shiga (STEC)	Adhesión y borrado (solo en STEC LEE+), fimbria AAFI, LAA	<i>Stx+</i>	Distal, íleon, Colon	Fago codificante de toxina Shiga. Otros factores pueden estar presentes	Diarrea sanguinolenta de moderada a severa hasta HC, HUS y trombocitopenia
<i>E. coli</i> Enteropatógena (EPEC) y típica	Adhesión y borrado	<i>eae+</i> , <i>bfpA+</i>	intestino delgado	Presenta tanto la intimina codificada por LEE como el pili plasmídico presente en el plasmido (EAF)	Diarrea acuosa profusa especialmente en niños menores de 5 años de
Atípica (aEPEC)	Adhesión y borrado	<i>eae+</i>	intestino delgado	Presencia de intimina	Diarrea acuosa profusa especialmente en niños menores de 5 años de
<i>E. coli</i> Enterotoxigénica (ETEC)	Mediado por CF	CFAs, LT, ST	intestino delgado	Presenta genes que codifican toxinas termoestable y o termolabil y Citolisina A	Diarrea acuosa aguda, especialmente en niños menores de 5 años de
<i>E. coli</i> Enteroinvasiva (EIEC)( <i>Shigella</i> )	NA (invasiva)	<i>ial+</i> , <i>aggR+</i>	Colon	Presencia de locus asociados con invasión (IAL) de los antígenos plasmídicos de invasión (IPA)	Shigelosis/ Disenteria bacilar
<i>E. coli</i> Enteroagregativa (EAEC)	Agrupación en forma de ladrillos o producir invasión	<i>aatA+</i> , <i>aggR+</i>	intestino delgado y/o Colon	Presenta el plasmido codificante de Aggr regulando y controlando genes asociados con adherencia agregativa. Cuenta con EAEC, enterotoxina estable al calor 1 (EAST1), <i>Shigella</i> enterotoxina 1 (ShET) y haemolisina (HlyE)	Diarrea del viajero, tipo persistente
<i>E. coli</i> de adhesión difusa (DAEC)	Adhesión difusa y/o invasiva	<i>afaC+</i>	Intestino	Presencia de adhesinas de superficie AfaE-1 y AfaE-III y/o adhesinas fimbriales (Dr) codificadas en el operón <i>Afa/dr/daa</i>	Diarrea acuosa en niños. Pudiendo contribuir a la enfermedad de Crohn's en adultos
<i>E. coli</i> adherente invasiva (AIEC)	NA (invasiva)	Sin caracterizar	intestino delgado	sin caracterizar	Puede contribuir a la enfermedad de Crohn's en adultos

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

Las denominadas STEC son un grupo muy diverso de cepas de *Escherichia coli* patógenas, capaces de generar cuadros diarreicos leves, colitis hemorrágica (CH) y lesiones sistémicas severas en el hombre. Cuentan con la capacidad de producir potentes citotoxinas capaces de inhibir la síntesis proteica en células eucariotas (Caprioli et al., 2005) .

Las toxinas producidas por esta clase de *E. coli* son denominadas indistintamente como toxinas Shiga (Stxs) por su similitud a la toxina producida por la *Shigella dysenteriae* tipo 1 o verotoxinas (VTs) por el efecto citotóxico producido en monocapas de células Vero (Caprioli et al., 2005). En este trabajo usaremos el termino toxinas Shiga (Stxs) (Caprioli et al., 2005; Gyles, 2007).

Existe una gran variedad de Stxs, siendo su producción el principal factor de virulencia de la bacteria y un marcador excelente a nivel de laboratorio para la identificación de STEC en diferentes matrices alimentarias o muestras clínicas . Esta aptitud permite diferenciar STEC de los demás patotipos al portar genes que le confieren la habilidad de producir al menos un tipo o subtipo de esta citotoxina (Caprioli et al., 2005; Gyles, 2007).

Las cepas pertenecientes a este grupo bacteriano fueron descritas por primera vez en 1977 por Knowalchuk y colaboradores, quienes determinaron que algunas cepas de *E. coli* recuperadas de niños con diarrea contaban con la particularidad de producir este tipo de toxina que afectaba a las células Vero. Posteriormente se encontró relación estructural e inmunológica con la toxina Shiga al ser neutralizada por anticuerpos antitoxina Shiga (Kaper y O'Brien, 2015).

Años más tarde se identificó que existía asociación entre las infecciones producidas por STEC y el desarrollo de síndrome urémico hemolítico, evidenciándose el primer brote de enfermedad severa a causa de cepas STEC O157:H7 en el año 1982 en Estados Unidos, debido al consumo de hamburguesas (Brusa, Colello y Galli, 2019; Nataro y Kaper, 1998).

STEC es considerado un agente zoonótico al alojarse en numerosas especies animales a nivel intestinal, pudiendo diseminarse desde allí a los seres humanos (Rodríguez-Angeles, 2002) .

Los rumiantes principalmente los bovinos de carne y leche actúan como reservorios naturales, por lo que parece evidente que STEC pueda transmitirse de reservorios naturales a humanos no solo por contacto directo con estos animales portadores sino también por ingestión de agua o alimentos derivados de estos o contaminados con sus heces. Siendo considerado por este motivo hace más de tres décadas como un patógeno transmitido por los alimentos capaz de generar enfermedad

grave en seres humanos (Caprioli et al., 2005; Gyles, 2007; Rodríguez-Angeles, 2002) .

STEC es capaz de generar importantes brotes epidémicos con distribución mundial, instalando cuadros clínicos de enteritis asociados a 2 graves complicaciones como el síndrome urémico hemolítico (SUH) y el púrpura trombótica trombocitopénica (PTT), ambos integrantes de un grupo mayor de enfermedades caracterizado por microangiopatías trombóticas en varios órganos y sistemas (Gyles, 2007).

La clínica de la enteritis es muy variable ocasionando desde formas leves a graves como la colitis hemorrágica (CH) y sus complicaciones (Margall et al., 1997).

Los principales síntomas asociados al cuadro gastrointestinal son diarrea leve de tipo acuosa la cual puede evolucionar a sanguinolenta acompañándose de vómitos y dolor abdominal tipo cólico en algunos casos. Si bien se considera que el cuadro gastrointestinal es afebril, algunas cepas son capaces de producir fiebre de manera relativamente frecuente (Gyles, 2007; Margall et al., 1997) .

No obstante, alrededor del 90% de los pacientes que desarrollan enfermedad a causa de STEC y 33 % de los expuestos consiguen recuperarse sin mayores complicaciones (Rodríguez-Angeles, 2002) . En tanto el 10% de los pacientes que cursan enfermedad desarrollan SUH, falleciendo del 1 a 3% en etapa aguda, permaneciendo con secuelas a largo plazo alrededor del 30% mientras que el 67 % logra recuperarse completamente (Figura 2)

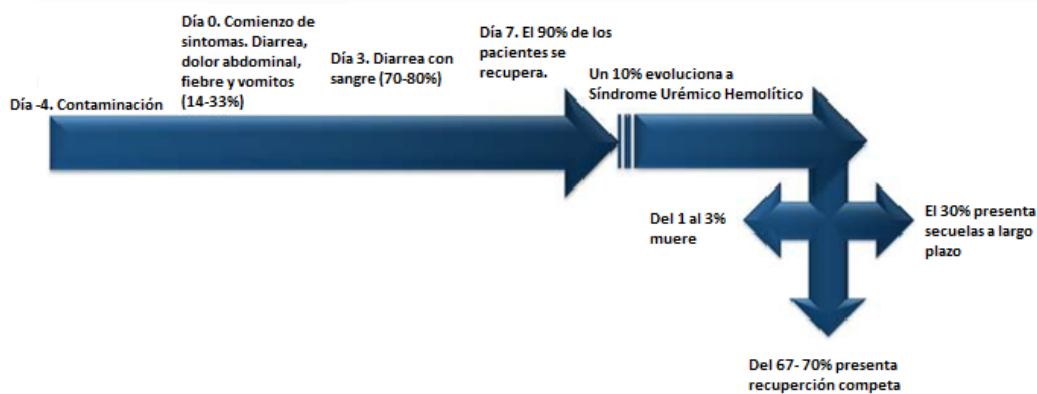


Figura 2. Evolución cronológica de la infección por STEC en donde se muestran las diferentes evoluciones posibles y su porcentaje estimado (Vázquez, 2020).

El principal factor que influye en la aparición de lesiones graves es la capacidad toxicogénica de STEC, actuando a nivel de la unidad 60S ribosomal alterando la síntesis proteica de las células intestinales o renales del hospedador (Rodríguez-Angeles, 2002) .

Cabe destacar que factores propios del hospedador como, edad, sexo y estado inmunológico pueden contribuir en la aparición de la enfermedad y nivel de gravedad (Caprioli et al., 2005).

La capacidad de producir toxinas no es un fenómeno exclusivo de las STEC, existe otro patotipo diarreogénico denominado Enterotoxigenico (ETEC) capaz de producir la misma tarea. La principal diferencia entre ambos radica en el tipo de toxina producida, siendo las generadas por ETEC del tipo citotónicas mientras que las sintetizadas por STEC son del tipo citotóxicas (Farrokh et al., 2013).

Las cepas de STEC pueden clasificarse a través de una gran variedad de técnicas en función de características fenotípicas, serológicas y moleculares como PCR, WGS que permiten detectar la presencia de genes de virulencia y de resistencia (Caprioli et al., 2005; Farrokh et al., 2013).

La serotipificación es ampliamente utilizado para llevar a cabo la caracterización de STEC. El método clásico se basa en enfrentar a las cepas en estudio con diferentes sueros permitiendo determinar de esta manera los tipos de antígeno O y H presentes en la célula (Gyles, 2007). Estas cuentan con 180 tipos de antígenos somáticos (O) y 53 flagelares (H) en cepas móviles lo que permite realizar variedad de combinaciones apoyándose en el esquema de clasificación de Kaufman (Gyles, 2007).

Hasta el momento se han identificados más de 500 serotipos de STEC de los cuales el mayormente estudiado por la facilidad de su identificación fenotípica y por ser prevalente en algunos países, es O157:H7. Debido a la relevancia que toma este serotipo las cepas STEC se organizaran en dos categorías, O157 y no-O157 (Gyles, 2007).

Tanto las cepas del tipo O157 como las no-O157 generan enfermedad con diferente severidad y frecuencia. Es en función de esto que los cultivos STEC fueron organizados clásicamente en diferentes seropatotipos de la A a la E siendo las denominadas A las más virulentas como es el caso de la O157:H7 y su variante inmóvil mientras que las cepas del tipo E no se asocian a enfermedades en humanos (Gyles, 2007; Kaper, Nataron, Mobley 2004; Nataro et al., 2018).

En relación a las cepas del grupo B su impacto en la salud es similar al de O157 con la diferencia de que producen brotes con menor frecuencia, dentro de estas encontramos O26H:11, O103H:2, O26H:11, O103H:2, O111NM, O121:H19 y O145: NM. En tanto las cepas incluidas en el grupo C como O91:H21 y O113 se dan con poca frecuencia al igual que las pertenecientes en el grupo D, implicados en casos esporádicos de síndrome urémico hemolítico y diarrea respectivamente (Gyles, 2007; Kaper et al., 2004; Nataro, Steiner y Guerrant, 2018).

Como se mencionó anteriormente, los factores de virulencia presentes en STEC es otro de los criterios empleados para su clasificación, y en base a estos factores es que se denominan cepas típicas y atípicas (Blanco, 2012; Caprioli et al., 2005).

Las cepas atípicas son aquellas STEC que carecen del gen *eae* responsable de la adherencia íntima de la bacteria al enterocito, pudiendo presentar eventualmente la capacidad de producir entero hemolisinas y otros factores de adherencia; mientras que las cepas típicas además de contar con estos factores de virulencia sintetizan la proteína íntima que colabora a la adherencia en el enterocito (Blanco, 2012; Caprioli et al., 2005).

La íntima es el factor de virulencia adicional más importante de las STEC, aunque no es exclusivo de este patotipo encontrándose también como mecanismo de adhesión en *Escherichia coli* enteropatógenas clásicas (EPEC), típicas y atípicas.

Esta proteína permite colonizar la mucosa intestinal al lograr que la bacteria se adhiera de manera íntima al enterocito. El resultado de esta unión produce la pérdida de vellosidades intestinales, la cual es característica y definida como lesión de adhesión y borrado (A/E) (Blanco, 2012; Caprioli et al., 2005).

Este factor de virulencia es una adhesina, una proteína de membrana externa de 94 kilodalton a través de la cual STEC se ancla al enterocito y genera cambios a nivel de su citoesqueleto (Farfán-García et al., 2016). Es codificada por el gen *eae* que forma parte de la isla de patogenicidad LEE (*locus of enterocyte effacement*) y su expresión es regulada por genes plasmídicos (Farrokh et al., 2013; Gyles, 2007; Rodríguez-Angeles, 2002).

La isla de patogenicidad LEE (Figura 3) se encuentra encargada de fabricar todas las proteínas necesarias para la adherencia de la bacteria al enterocito. Sintetiza el sistema de secreción tipo tres (TTSS); la íntima acompañada de su receptor (TIR) y proteínas de translocación (Farrokh et al., 2013; Gyles, 2007; Rodríguez-Angeles, 2002).

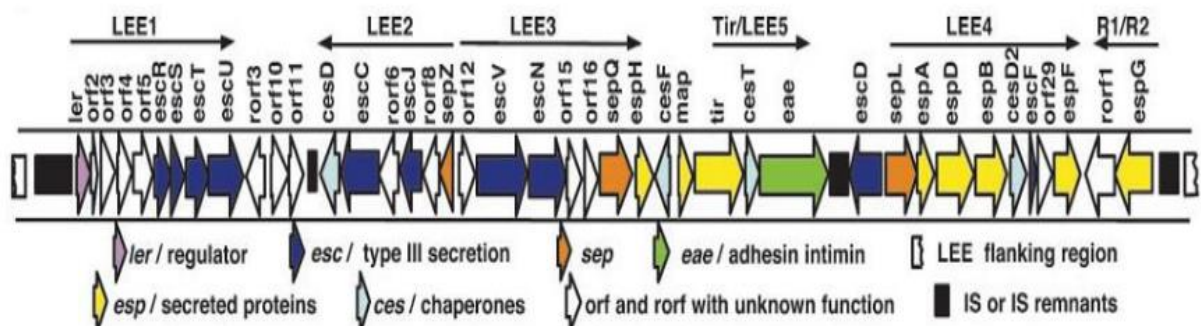


Figura 3. Organización genética de la isla de patogenicidad LEE. Estructura de la isla de patogenicidad LEE de las cepas de *E. coli* E234/69 (EPEC, O127:H6). Los genes se colorean de acuerdo a su categoría funcional. La organización en operones de la isla (LEE1 a LEE7 se indican con flechas sobre los genes, mientras que las unidades de transcripción individuales aparecen sin flechas (*etgA*, *cesF*, *map* y *EscD*) (Deng et al., 2004).



Cabe destacar que se han identificado muchas variantes de intimina siendo las más relevantes la  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\epsilon$  e  $\gamma$ . Esta diversidad de proteínas de adhesión se debe a que el gen *eae* encargado de codificarla presenta gran variabilidad en su extremo 3' el cual a su vez codifica la parte de la molécula denominada C-terminal, implicada en la unión al receptor TIR (receptor translocado de intimina) (Caprioli et al., 2005; Gyles, 2007).

Cada variante de intimina se asocia con diferentes serotipos de STEC y EPEC. La variante  $\alpha$  se encuentra principalmente en cepas EPEC mientras que la  $\beta$  se asocia tanto a cepas de este patotipo como STEC, siendo el serogrupo más importante el O26 (Caprioli et al., 2005; Gyles, 2007).

En tanto la variante  $\epsilon$  se vincula con los serogrupos O103 y O121 enterohemorrágicas, mientras que la  $\gamma$  se asocia a los serogrupos O157, O111 y O45 del mismo patotipo. (Caprioli et al., 2005; Gyles, 2007).

La comunicación molecular entre STEC y los enterocitos esta mediado por el sistema de secreción tipo III. Este actúa como una jeringa molecular que conecta el citoplasma de la bacteria con el de la célula blanco (Caprioli et al., 2005; Gyles, 2007).

A través del mismo se transfieren las proteínas codificadas por LEE incluyendo el receptor TIR y proteínas efectoras que subvierten las funciones normales de la célula eucariota (Caprioli et al., 2005; Gyles, 2007).

El receptor TIR se incorpora al citoplasma del enterocito permitiendo que la intimina se ensamble sobre él generando así, la adhesión permanente de la bacteria. Tanto TIR como las otras de las proteínas secretadas activan una serie de señales en cascada dando como resultado final el reorganización del citoesqueleto del epitelio intestinal alterando tanto su arquitectura como su fisiología (Gyles, 2007).

Los cambios estructurales que genera el microorganismo sobre el enterocito constan de la pérdida de microvellosidades y la formación de una estructura denominada pedestal (Caprioli et al., 2005; Farfán-García et al., 2016; Gyles, 2007).

El pedestal es producto de la acumulación de proteínas del citoesqueleto debajo de las bacterias adheridas, debido al reordenamiento y polimerización del citoesqueleto de actina del epitelio (Caprioli et al., 2005; Farfán-García et al., 2016; Gyles, 2007).

Las cepas STEC que presentan la isla de patogenicidad LEE que confiere la habilidad de sintetizar tanto el pedestal como la intimina, están asociadas a casos severos de enfermedad en humanos. En tanto las STEC LEE-negativas rara vez se aíslan de casos de diarrea sanguinolenta o SUH y generalmente no se incluyen entre EHEC, aunque algunas cepas LEE negativas son capaces de desarrollar estos cuadros (Askar et al., 2011).

La capacidad de producir diarrea sanguinolenta y SUH por cepas LEE- negativas se evidenció en Alemania en mayo del 2011, donde se reportaron 470 casos de SUH y diarrea sanguinolenta debido a la infección producida por STEC O104:H4. Este serotipo es inusual en este tipo de brotes ya que se caracteriza por ser intimina negativo, lo que pone de manifiesto la potencial capacidad de algunas cepas para producir lesión grave en el hombre a pesar de carecer de la isla de patogenicidad LEE (Askar et al., 2011).

A partir del brote de SUH producida por la STEC O104 se determinó que algunas cepas eran capaces de adquirir factores de virulencia característicos de otro patotipo diarreogénicos (cepas híbridas) o también incorporar genes de cepas extra intestinales (heteropatógenos) (Askar et al., 2011).

Las STEC diarreogénicas capaces de adquirir dos o más genes de virulencia de una cepa con otro patotipo diarreogénico son denominadas híbridas siendo un ejemplo de estas la O104:H4 (EAEC-STEC), mientras que las cepas extraintestinales con la habilidad de adquirir factores de virulencia de cepas diarreogénicas son llamadas heteropatógenas (Askar et al., 2011).

## 2.4 Toxina Shiga

La toxina Shiga, uno de los principales factores de virulencia de las STEC y uno de los más potentes venenos biológicos conocidos, fue descrita por primera vez por Conraid en el año 1903 (Gyles, 2007).

La habilidad de producir esta toxina por parte de las STEC se ve mediada por la presencia de genes *stx* que codifican su síntesis. Estos son genes lisogénicos de bacteriófagos tipo  $\lambda$  e incorporados al genoma estable de la bacteria (Gyles, 2007).

Esta citotoxina presenta un peso molecular de 70 kilodalton (kDa), es de naturaleza proteica con una estructura del tipo AB<sub>5</sub>, por lo que está conformada por una subunidad A ligada de manera no covalente a cinco subunidades B (Gyles, 2007).

La subunidad A de la toxina tiene un peso molecular de 32 kDa, está conformada por dos fragmentos, A1 (27.5 kDa) y A2 (7.5 kDa) los cuales se encuentran unidos mediante un puente de disulfuro. Esta subunidad presenta actividad enzimática ARN-glicosidasa, permitiendo que la toxina inhiba la síntesis proteica en células eucariotas al eliminar un residuo de adenina del ARN ribosómico 28 s de la unidad 60 s ribosomal generando así la apoptosis celular (Aigal y Romer, 2015; Gyles, 2007).

En tanto, las subunidades B a nivel estructural son un pentámero de fracciones idénticas, cada una con un peso molecular de 7,7 kDa aproximadamente. Se encargan de mediar la unión de la exotoxina con los receptores celulares específicos de superficie denominados Gb<sub>3</sub> (globotriaosilceramida), que permitiera la internalización de la toxina a la célula eucariota (Probert, McQuaid y Schrader., 2014; Yang et al., 2020).

Basándonos tanto en las diferencias antigénicas como estructurales que presenta la toxina Shiga podemos identificar dos tipos, la Stx1 y Stx2. Ambas presentan el mismo mecanismo de acción y comparten únicamente el 55 % de identidad en la secuencia de aminoácidos de la subunidad A de la toxina (Probert et al., 2014; Yang 2020).

La toxina Stx2 presenta múltiples variaciones de secuencia, a diferencia del tipo Stx1 que cuenta con una estructura altamente conservada que a su vez es idéntica a la toxina Shiga producida por *Shigella dysenteriae* tipo 1. De este modo se han identificado únicamente cuatro subtipos de Stx1 (a, c, d y e), mientras que en el caso de la variante Stx2 al tener una mayor variabilidad se han reconocido 11 subtipos nombradas de la a hasta la k (Probert et al., 2014; Yang et al., 2020).

Cabe destacar que una cepa STEC puede producir más de un tipo o subtipo de toxina, aunque algunas solo sintetizan una única. Se ha comprobado que la severidad de la enfermedad desarrollada se relaciona con el tipo de toxina producida por la bacteria (Croxen et al., 2013; Gyles, 2007; Yang et al., 2020).

Es relevante mencionar que, si bien las moléculas Stx2 presentan una toxicidad mil veces mayor a nivel de las células endoteliales de la microcirculación renal en relación a las Stx1, los subtipos Stx2a y Stx1a son los más comúnmente asociados a cuadros graves de enfermedad en humanos (Croxen et al., 2013; Gyles, 2007; Yang et al., 2020).

Para que la toxina Shiga sea capaz de producir enfermedad en humanos ya sea patologías gastrointestinales como la colitis hemorrágica o manifestaciones severas como síndrome urémico hemolítico, es necesario que STEC ingrese al organismo para secretar las exotoxinas a nivel intestinal, que luego serán translocadas al interior actuando a nivel local y sistémico (Farfán-García et al., 2016).

Como se mencionó anteriormente STEC es vehiculizada mediante la ingesta de alimentos o agua contaminada produciendo las toxinas una vez instaladas en el intestino, es por este motivo que las infecciones producidas por ella son denominadas toxico infecciones (Farfán-García et al., 2016).

El ingreso de la toxina al interior de las células “blanco” puede realizarse mediante pinocitosis, endocitosis o macropinocitosis, esta última se produce cuando la célula a la cual ingresara la toxina no presenta receptores del tipo GB3 como sucede en los enterocitos (Farfán-García et al., 2016).

## 2.5 Mecanismo de acción y patogenia de la toxina Shiga:

Las STEC para lograr producir la toxina Shiga y generar perjuicio en la salud, deben ser capaces de sortear múltiples mecanismos de defensa del hospedador luego que ingresa al mismo junto con agua o alimentos (Gyles, 2007; Karpman y Ståhl, 2014).

Para esto es necesario que la bacteria logre la colonización del intestino grueso, lo cual involucra múltiples procesos y una compleja interacción entre factores tanto bacterianos como del hospedador (Gyles, 2007; Karpman & Ståhl, 2014).

EL pH estomacal ácido es uno de los mecanismos de defensa más relevantes del hospedador que generalmente es sorteado sin problema por STEC ya que esta se caracteriza por ser un microorganismo relativamente ácido- tolerante (Karpman & Ståhl, 2014).

Una vez ya alojada a nivel intestinal las sales biliares presentes contribuirán con la migración de la bacteria a otras regiones del tracto, aunque deberá competir con otros microorganismos intestinales para establecerse y colonizar (Karpman & Ståhl, 2014).

El proceso de colonización bacteriana se verá influido por la presencia de ácidos grasos de cadena corta como acetato, propionato y butirato a nivel del intestino delgado y grueso. Estos son producto de la fermentación de carbohidratos por parte del microbiota intestinal, que al encontrarse en altas concentraciones desencadenan la expresión de genes que contribuyen con la adherencia de la bacteria al colon y la síntesis de receptores de toxina, generando en el hospedador una mayor susceptibilidad a esta (Karpman & Ståhl, 2014).

Cabe destacar que la presencia de STEC a nivel intestinal llevara a la interacción de estas tanto con el microbiota como con hormonas del hospedador. A nivel hormonal se establecerá un incremento de las catecolaminas las cuales estimulan la motilidad bacteriana y la adhesión entre otras (Batt y Tortorello, 2014; Gyles, 2007; Karpman & Ståhl, 2014).

El tipo de adhesión a las células del epitelio intestinal variará notablemente dependiendo de los genes de virulencia que presenta STEC. Es en función de esto que se distinguen dos patrones de adherencia y lesión de las células intestinales dependiendo de la presencia o ausencia del gen *eae*, que como ya se mencionó codifica la proteína de membrana externa llamada intimina la cual produce tanto una adhesión íntima al enterocito como una lesión característica. (Batt, 2014; Gyles, 2007; Karpman & Ståhl, 2014).

Las cepas que carecen del gen *eae* son denominada LEE- ya que no presentan la isla de patogenicidad LEE en la cual se encuentra este y otros genes , por lo que

este tipo de cepas no presentan un patrón de adhesión íntimo y del cual no se tiene gran conocimiento (Gyles, 2007; Karpman & Ståhl, 2014).

En tanto las cepas LEE + al contar con el gen *eae* presentan con un mecanismo de adhesión íntimo a través de la síntesis de una proteína de membrana externa denominada intimina que no solo anclara la bacteria al enterocito, sino que genera cambios a nivel del citoesqueleto de este (Farfan, Cantero, Vidal, Botkin y Torres, 2011).

La adherencia inicial al enterocito en cepas LEE+ es mediada por la fimbria polar larga (Ipf) seguido de una adhesión íntima a través de la proteína intimina (Farfan et al., 2011) .

Como se mencionó anteriormente esta proteína es codificada por la isla de patogenicidad LEE que además sintetiza el receptor al cual se anclara la intimina al enterocito (TIR) y el TTSS mediante el cual se inyectaran proteínas efectoras en la célula eucariota que subvierten sus funciones contribuyendo con la supervivencia bacteriana. Esta adhesión producirá la formación de una estructura denominada pedestal y a la pérdida de las vellosidades intestinales conocida como lesión de adhesión y borrado generando que los enterocitos pierdan capacidad de absorción de solutos en el lumen intestinal y se instale una diarrea del tipo acuosa (Farfán-García et al., 2016).

Una vez que STEC se encuentra asociada a las vellosidades del tubo digestivo, secreta la toxina Shiga hacia el lumen intestinal. El colon es el primer sitio de acción nocivo de STEC, provocando inflamación local que a su vez favorece el ingreso de las toxinas Stx al interior del hospedero (Schü, 2011).

Se han propuesto algunas vías por las cuales las Stx se translocan a través del epitelio intestinal : A) transcitosis independiente de Gb3; B) transporte paracelular durante la migración de polimorfonucleares a la luz intestinal; C) transporte celular retrogrado mediado por Gb3 y liberación en la lámina propia luego de la muerte celular; D) Transcitosis a través de las células M (Figura 4.) (Schü, 2011).

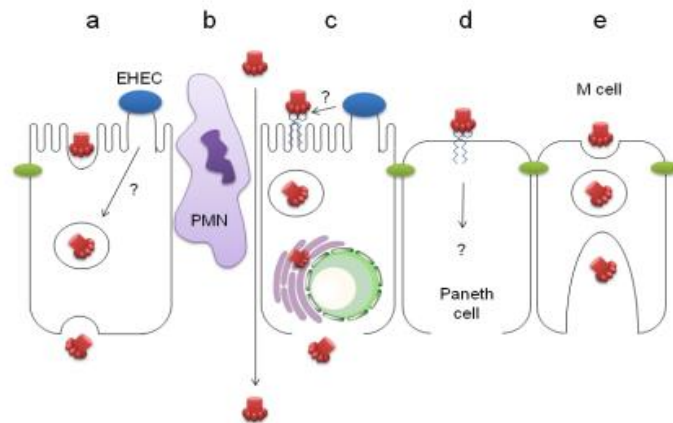


Figura 4. Posibles rutas de translocación de Stx a través del epitelio intestinal humano: a) Transcitosis independiente de Gb3, posiblemente agravada por la infección por EHEC; b) Paracelular transporte durante la trans migración de neutrófilos (PMN); c) Inducción de la expresión de Gb3 por Infección por EHEC, transporte retrógrado y liberación de Stx después de la muerte celular; d) Dependiente de Gb3 translocación por células de Paneth; e) Transcitosis por células M (Schü, 2011).

Stx llega a los receptores Gb3 presentes en la membrana apical de las células endoteliales vasculares del colon, y mediante la fracción B de la toxina es internalizada produciendo daño localmente. Stx también es capaz de ingresar a la circulación general produciendo daño en la microvasculatura de múltiples órganos como los que integran el sistema nervioso central y riñones, entre otros (Fonseca, 2009).

La internalización de la toxina a las células blanco de estos órganos se realiza a través del proceso de endocitosis, aunque también puede efectuarse mediante macropinocitosis en el caso de células que no expresan los receptores Gb3 (Fonseca, 2009).

La endocitosis se lleva a cabo mediante vesículas endocíticas que dirigen a la toxina hacia el aparato de Golgi y de allí al retículo endoplasmático rugoso para inhibir la síntesis proteica. En el proceso de translocación intracelular de la toxina la subunidad A es dividida en dos fragmentos, A1 y A2 por acción de una enzima con actividad proteolítica (Fonseca, 2009).

El fragmento A1 libre llevara a cabo la inhibición irreversible de la síntesis proteica al remover una adenina de la subunidad 28S ribosomal desencadenando la apoptosis celular por acumulación de proteínas defectuosa (Paton y

Paton, 2006).

Si bien es cierto que el resultado de la interacción de la toxina a nivel intestinal se evidencia con la aparición de diarrea que en algunos casos es sanguinolenta debido al daño local provocado en los vasos sanguíneos del colon, debe señalarse que si

ingresa suficiente toxina a la circulación los órganos ricos en receptores Gb3 como los riñones, resultaran dañados (Paton & Paton, 2006).

Estos receptores se expresan en alta concentración en tejido endotelial, sistema nervioso central, riñón e intestino de niños menores de 5 años. La lesión producida en cada órgano es muy diversa generando desde la acumulación de trombos en la microcirculación cerebral acompañado de edema e infarto en el sistema nervioso central hasta el desarrollo de síndrome urémico hemolítico con falla renal y anemia hemolítica (Fonseca, 2009).



## 2.6 Reservorio de STEC:

Existen un gran número de animales capaces de portar STEC a nivel del tracto gastrointestinal (Caprioli et al., 2005). Este fenómeno se debe entre otros factores, a la carencia de los receptores sobre los cuales actúa la toxina Shiga denominados Gb3, por lo que portan y diseminan la bacteria sin desarrollar enfermedad (Persad y LeJeune, 2014).

Los rumiantes son el reservorio natural de esta bacteria, especialmente los bovinos actuando como punto de entrada en la cadena alimentaria (Fegan, Vanderline, Higggs y Desmarchelier 2004).

El ganado vacuno es considerado el principal reservorio además de ser la mayor y más importante fuente de infecciones humanas. Se han identificado más de 400 serotipos de STEC en humanos y todos fueron aislados en bovinos (Di Pillo & Sotomayor, 2017; Etcheverría et al., 2013).

STEC coloniza la porción terminal del intestino grueso de bovinos denominada unión recto – anal y desde allí será excretada junto con las heces al medio. La excreción se ve influida por múltiples factores, algunos conocidos como categoría animal, época del año, tipo de alimentación y sistema de cría (Di Pillo & Sotomayor, 2017; Etcheverría Analía et al., 2013).

Entre los animales positivos a STEC existe un porcentaje denominado super-eliminadores, estos eliminan grandes cantidades del microorganismo junto con las heces e incrementan la transmisión y persistencia dentro de un rodeo (Di Pillo & Sotomayor, 2017; Etcheverría Analía et al., 2013).

Los terneros cuentan con una tasa de excreción bacteriana significativamente mayor que la de los bovinos adultos, presentando su pico máximo inmediatamente después del destete. Estudios realizados en ganado vacuno demostraron que la tasa de excreción de STEC O157 en heces correspondía al 1,5% en terneros menores de dos meses, entre 1,8% a 5% en terneros de entre dos a cuatro meses, disminuyendo significativamente posterior a este periodo tanto en frecuencia e intensidad (Smith, Paiba y Ellis-Iversen, 2010). Sin embargo, Cobbold,(2004) demostró en otro trabajo que las vaquillonas de granjas lecheras portan STEC con mayor frecuencia.

La estacionalidad es otro de los factores que influye en la propagación del microorganismo, evidenciándose una mayor excreción por parte del ganado en los meses cálidos abarcando el verano y principios de otoño.

El sistema de cría animal es otro de los factores que intervendría en el grado excreción de STEC. En los feedlots, los factores de estrés ambiental y nutricional como los cambios de dieta, la gran cantidad de barro y el exceso de humedad disminuyen la resistencia transitoria de los animales a la colonización por STEC,

provocando la excreción y el mantenimiento de una alta prevalencia en los animales en el corral de engorde (Smith et al., 2010).

Cabe destacar que, si bien el ganado vacuno es considerado el principal reservorio de STEC, en otros países como Australia los ovinos cumplen un rol clave como reservorio siendo considerado allí el principal (Fegan et al., 2004). Los ovinos junto con otros pequeños rumiantes como cabras y ciervos cumplen un rol fundamental con respecto a la diseminación ambiental del microorganismo.

En mamíferos no rumiantes como caballos, perros y cerdos también se ha logrado aislar STEC, pero de manera esporádica. Estos animales son denominados reservorios de desbordamiento, viven en torno a granjas y al igual que los rumiantes son colonizados por el microorganismo contando con la capacidad de transmitirlo, pero se diferencian de estos ya que una vez que no se encuentran expuestos a la fuente de STEC son incapaces de mantener la colonización intestinal (Persad & LeJeune, 2014).

Si bien los animales son considerados el principal reservorio de STEC, los humanos pueden serlo desempeñando un papel clave en la epidemiología de la infección como es el caso de los portadores asintomáticos. Estos ocupan un papel de suma importancia en relación a la propagación de brotes mediante el contacto entre personas como a través de la contaminación ambiental y alimentaria mediante la diseminación por parte de trabajadores asintomáticos (Persad & LeJeune, 2014).

Estudios realizados en familias que desarrollaban actividades en tambo en Canadá, determinaron que un 12 % de estas personas presentaban *Escherichia coli* O157 en las heces sin manifestar signos ni síntomas de enfermedad. Similar es lo que sucede en trabajadores de mataderos, en los que se encontró que el 1.3% no presentaba sintomatología asociada a la infección por STEC eliminándola a través de las heces, esta situación cobra gran relevancia en manipuladores de alimentos. Es por este motivo que la contaminación por individuos asintomáticos podría ser la fuente de muchos brotes generados por STEC ya que casi un 30% de estos son de origen desconocido siendo esta la posible causa (Persad & LeJeune, 2014).

Los reservorios animales adquieren el microorganismo del mismo modo que el ser humano, mediante la ingesta de alimentos o aguas contaminadas e inclusive a través del contacto de heces de animales infectados. Se ha evidenciado que el movimiento de animales entre granjas contribuye con el riesgo de adquirir el microorganismo (Persad & LeJeune, 2014).

Los abrevaderos de los cuales toman agua los bovinos es una de las principales fuentes de contaminación, ya que en caso de presentar estiércol de animales portadores la bacteria logra permanecer allí hasta cuatro meses propagándola a quienes la consuman. Del mismo modo el consumo de leche proveniente de vacas con mastitis es una fuente de contaminación y transición en ternero (Persad & LeJeune, 2014).

La dosis infectante en bovinos es de 300 unidades formadoras de colonias, permitiendo que este una vez infectado sea capaz de excretar en las heces altos niveles. En el caso de *Escherichia coli* O157 se han evidenciado una excreción de  $1,1 \times 10^5$  unidades formadoras de colonias por gramo de heces durante un periodo aproximado de 10 semanas (Persad & LeJeune, 2014).

## 2.7 Síndrome urémico hemolítico:

El síndrome urémico hemolítico (SUH) es una patología multisistémica caracterizada por la presencia de anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia, plaquetopenia, lesión neurológica e insuficiencia renal aguda con potencial evolución a crónica acompañado muchas veces de diarrea sanguinolenta (Creydt et al., 2006; Rivero, Padola, Etcheverrias y Parma, 2004).

Si bien en esta entidad clínica se identifica una gran lesión renal por el desarrollo de una microangiopatía selectiva, puede instalarse lesión isquémica tanto a nivel del sistema nervioso central, retina, miocardio, páncreas e intestino (Rivero et al., 2004) .

Fue descrito por primera vez en Suiza en el año 1955 por el medico Conrad von Gasser. Años más tarde se identificaron casos en diversos países, presentándose una menor incidencia en los industrializados como EEUU, Canadá y Japón. En América del Sur se la considera una enfermedad tanto endémica como epidémica por presentar una incidencia significativamente mayor, especialmente en Argentina (Rivero et al., 2004; Silberstein, Pistone, Gerhardt, Nuñez y Ibarra, 2008) .

Actualmente este país presenta la mayor tasa de SUH del mundo (Figura 5) siendo esta la principal causa de insuficiencia renal aguda y la segunda de insuficiencia renal crónica en niños, además de ser causante del 20% de los trasplantes renales en niños y adolescentes (Rivero et al., 2004; Silberstein et al., 2008) .

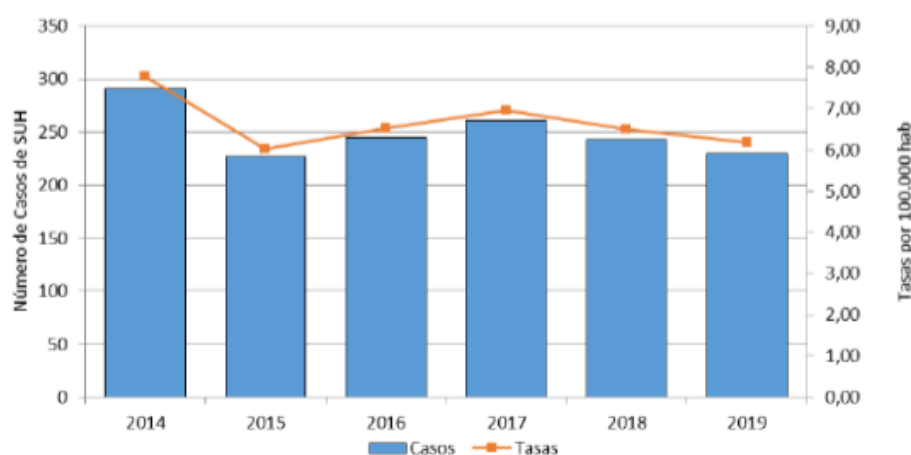


Figura 5. Número de casos y tasas notificadas de SUH en Argentina en menores de 5 años en el periodo 2014-2019 (*Boletín Integrado de Vigilancia*, 2019).

El SUH es una patología de distribución mundial, con una incidencia global anual cada 100000 habitantes de 2,1 casos, presentando un pico en menores de cinco años con 6,1 casos y una menor incidencia en personas de 50 a 59 años con una tasa de 0,5 casos (Barslund, Benitez, Horacio, Wilka, 2007).

Argentina es considerado el país con mayor número de casos de SUH a nivel mundial con una prevalencia global de 0,6 casos cada 100.000 habitantes, 6,3 en menores de cinco años y 12,9 cada 100.000 niños de un año, presentando una mortalidad de 17% (Brusa et al., 2020).

A diferencia de Argentina, la notificación de casos de SUH no es obligatoria en la mayoría de los países. A pesar de esto, Canadá, Uruguay y Australia, presentan prevalencias globales similares a la Argentina contando con una tasa de casos de 1,9, 0,4 y 0,07 cada 100.000 habitantes respectivamente (Brusa et al., 2020).

La mayor incidencia de la enfermedad se produce en niños menores de cinco años. En esta franja etaria Uruguay presenta una prevalencia aproximada de 5,4 casos cada 100.000, Canadá 4,2 y 1,4 en Estados Unidos (Brusa et al., 2020).

La etiología de este síndrome puede ser del tipo idiopática, infecciosa y no infecciosa produciendo este último un cuadro atípico. Entre los agentes infecciosos asociados a esta patología se destacan: *Shigella*, *Salmonella*, *Streptococcus pneumoniae*, *Yersinia*, *Campylobacter*, *Aeromonas*, *Clostridium difficile* y *Escherichia coli* (Rivero et al., 2004) .

*Escherichia coli* productora de toxina Shiga es considerado el principal microorganismo causante de síndrome urémico hemolítico post-entérico, debido a la gran cantidad de casos asociados a la infección producida por esta bacteria. Es considerada una enfermedad transmitida por los alimentos, ya que el ingreso de la bacteria se realiza mediante la ingesta de alimentos contaminados con STEC, especialmente los elaborados a base de carne bovina (Rivero et al., 2004; Schelotto, 2016).

La vía de transmisión más importante es del tipo fecal-oral, mediante la ingesta de alimentos contaminados. Los rumiantes especialmente los bovinos, son el principal reservorio de STEC. Esta bacteria se aloja a nivel intestinal del ganado sin producir perjuicio en la salud, ni en su eficiencia de producción siendo de este modo eliminados de manera intermitente a través de las heces que pueden contaminar el agua empleada para riego y transmitirse a través del consumo de vegetales (Di Pillo y Sotomayor, 2018).

Durante el proceso de faena las carcasas vacunas pueden contaminarse con heces de bovinos infectados con STEC, es por este motivo que los productos cárnicos representan uno de los alimentos más frecuentes asociados al desarrollo de SUH, aunque también puede transmitirse por gran variedad de alimentos (Di Pillo & Sotomayor, 2018).

No obstante, los alimentos no son la única fuente capaz de vehicular STEC, puede realizarse mediante la ingesta de aguas contaminadas no cloradas, a través del contacto directo con animales infectados o por la propagación entre personas durante un brote (Belardo, 2014; Di Pillo & Sotomayor, 2018; Silberstein et al., 2008).

El desarrollo de SUH, está determinada por la presencia de STEC a nivel intestinal. Desde allí la bacteria secreta toxina en cantidades necesarias para atravesar el epitelio intestinal y alcanzar la circulación sanguínea. La toxina una vez en la sangre producirá lesión a nivel de las células endoteliales de la microcirculación del colon, riñón y sistema nervioso central como consecuencia de la unión a los receptores Gb3 presentes en las células (Caprioli et al., 2005; Silberstein et al., 2008).

El daño producido en los órganos anteriormente mencionados es debido a la presencia de un alto contenido de receptores Gb3, en especial el riñón resultando el más dañado en este síndrome (Caprioli et al., 2005; Silberstein et al., 2008).

Cabe destacar que, si bien los dos tipos de toxina Shiga son capaces de desarrollar la patología, el tipo Stx2 cuenta con mayor potencial de generarla (Caletti, Petetta, Jaitt, Casaliba y Gimenez, 2006).

Se estima que entre el 2-5 % de individuos que desarrollaron este síndrome fallecen a causa de esta afección (Caletti et al., 2006).

Tanto a nivel mundial como regional Argentina presenta la mayor incidencia anual siendo de 12,9 casos cada 100.000 menores de 1 año, contando aproximadamente con 500 casos nuevos por años (Caletti et al., 2006).

En nuestro país no es todavía una enfermedad de denuncia obligatoria, lo cual dificulta determinar la incidencia en la población, aunque se estima que su incidencia anual es de unos 5/100.000 niños menores de 5 años, sin desarrollo de brotes epidémicos (Schelotto et al., 2016).

## **2.8 Medidas para disminuir la exposición a STEC e incidencia de SUH:**

Como se mencionó anteriormente este síndrome está directamente asociado con el consumo de agua o alimentos contaminados con STEC. Es por este motivo que para disminuir el impacto sanitario se debe realizar un control a nivel de la industria alimentaria y aplicar programas de educación a la población sobre las vías de transmisión haciendo énfasis en las estrategias de prevención, incluyendo educación sobre prácticas culinarias y manejo de los alimentos (Brusa et al., 2020).

Informes recientes han señalado el papel de los portadores asintomáticos en la transmisión de STEC de persona a persona por vía feco-oral (Brusa et al., 2020).

Se ha determinado que el contacto con los animales en las granjas y la presencia de niños menores de cinco años en contacto con estos que asisten a guarderías es considerado un factor de riesgo para el desarrollo de infección por STEC (Brusa et al., 2020)

Recientemente se ha demostrado que alrededor del 60,0% de todos los casos de STEC notificados en todo el mundo no pueden atribuirse a una fuente alimentaria, a pesar de que el 40,0% de los casos se asociaron con alimentos, principalmente carne de res (18,2%), verduras (15,6%) y productos lácteos (5,5%) (Antman, Geffner, Pianciola y Rivas, 2014).

El control de la industria cárnica resulta crítico ya que los principales alimentos asociados al SUH son los provenientes de esta industria. Es necesario que cuenten con buenas prácticas de manufactura, así como higiénicas durante la elaboración del alimento (Antman et al., 2014).

Por otra parte, el consumidor debe realizar una adecuada cocción y manejo de la carne cruda, especialmente el tipo picada. El centro térmico del producto debe llegar a una temperatura mayor a 70°C durante un periodo mayor a dos minutos para asegurarse la inactivación de STEC en caso de estar presente (Antman et al., 2014).

Asimismo, se recomienda consumir únicamente agua potable, evitar el contacto con animales portadores, realizar un adecuado lavado tanto de frutas como verduras e ingerir productos lácteos o derivados que se encuentren pasteurizados (Antman et al., 2014).

## 2.9 Producción:

La industria cárnica representa uno de los principales ingresos del país, aportando un 6% por ciento del producto bruto interno generado por la comercialización local y exportación. Uruguay es considerado el mayor exportador de carne bovina a nivel mundial en relación al volumen de su población (Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, INIA, s.f.).

El 59,6% del territorio nacional se encuentra dedicado a la actividad ganadera de forma exclusiva, presentando un sistema de cría tanto intensivo de engorde a corral como extensivo siendo este último el más implementado (INIA, s.f.).

En el año 2020 Uruguay contaba con un stock bovino de 11.881 millones de animales de los cuales está conformado por una alta proporción de vacas de cría (37%), terneros (25%) y vaquillonas de uno a dos años de edad (11%) (INAC, 2020).

En nuestro país el consumo anual de proteína animal es aproximadamente de 85,6 kg por habitante, de los cuales 45,7 corresponde a carne vacuna representando un 53% de la ingesta. Cabe destacar que, si bien la carne bovina es la más consumida en especial el tipo picada, también se destacan como fuente de proteína, la aviar (20%), suina (16%) y ovina (2%) (INAC, 2020).

Actualmente contamos con 42 frigoríficos habilitados para realizar la faena de ganado bovino, ovino y suino con destino a consumo interno y / o exportación. Estos pueden clasificarse en tres categorías según capacidad de sacrificio diario y tipo de habilitación (*Establecimientos Habilitados Por La DIA*, 2021).

Los predios categoría I corresponden a los frigoríficos de porte mediano a grande con una capacidad de procesar entre 200 a 800 animales diarios con habilitación nacional y/ o exportación. En relación a los predios categoría II, cuentan con una capacidad para sacrificar de 4 a 30 animales diarios con habilitación zonal o departamental, en tanto la categoría III cuentan únicamente con habilitación local faenando diariamente hasta tres animales (*Establecimientos Habilitados Por La DIA*, 2021).

La faena nacional alcanzó los dos millones de bovinos en el año 2020, de los cuales el 47,6 % estaba conformado por novillos, 36,6% vacas, 13,9% vaquillonas, 1,5% toros y 0,4% terneros. A nivel del mercado doméstico se comercializaron 97.778 toneladas de carne vacuna, exportándose 424.329 toneladas aportando una ganancia de 1.593 millones de dólares (Instituto Nacional de Carnes, INAC, 2020).

Según el Instituto Nacional de Carnes la faena en el primer semestre del presente año, alcanzo el mayor número de los últimos 3 años ascendiendo a 151 mil animales, de los cuales el 12,4% corresponde a vacunos criados a corral. Estos



valores superaron en un 11 % la faena correspondiente al 2020 y en un 27 % a la del 2019 (INAC, 2020).

Dentro de los principales países compradores de nuestra faena encontramos a China, considerado el principal destino y quien aporta el 47 % del total de ingresos del sector. En segundo lugar, se posiciona NAFTA comprendido por Estados Unidos y México, representando el 24 % de los ingresos percibidos por la exportación de carne vacuna, en tanto la Unión Europea es el tercer comprador de carne uruguaya aportando el 15% ( INAC, 2020).

Los productos mayormente exportados son carne congelada y refrigerada. En el año 2020 la carne congelada se ubicó en primer lugar exportándose 395.725 toneladas, seguido de la carne refrigerada con un total de 46.132 ( INAC, 2020).

La exportación del sector cárnico aporta unos 1936 millones de dólares de los cuales el 82% corresponde a la carne bovina ( INAC, 2020).

La inocuidad alimentaria juega un papel clave en la comercialización de la carne tanto a nivel nacional como internacional. Es por este motivo que la presencia de microorganismos patógenos como STEC en canales bovinas, representa una de las principales causas de rechazo tanto a nivel del mercado nacional como internacional ( INAC, 2020) (Figura 6).

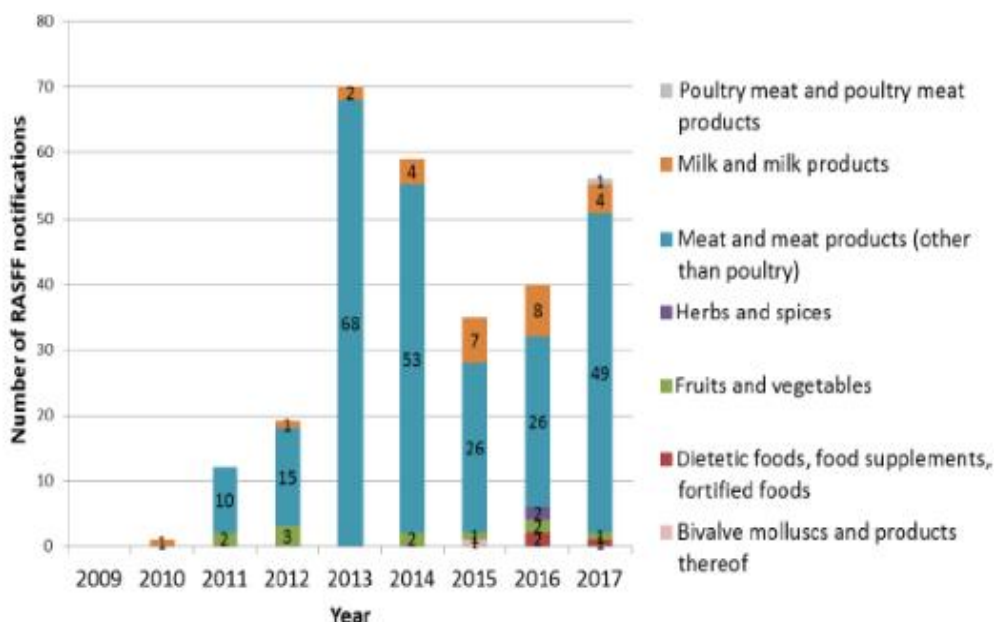


Figura 6. Porcentajes de notificaciones del portal Rasff asociadas a diferentes alimentos (Koutsoumanis et al., 2020)

La aparición de bacterias causantes de ETAs, como STEC a nivel cárnico puede ser consecuencia de un inadecuado sistema de calidad higiénico sanitario en etapas de faena y sacrificio animal (Varga Zambrano y Aguilar Galvez,2015).

STEC en bovinos es un habitante normal a nivel digestivo, y muy frecuentemente presente a nivel de cuero y piel. Por lo que la contaminación de las carcasas con heces bovinas, polvo o pelo por falta de buenas prácticas en su procesamiento, lleva a la contaminación de las canales con su posterior rechazo en mercados extranjeros (Varga Zambrano & Aguilar Galvez,2015).

Cabe destacar que una vez finalizada la faena se realiza una reinspección en las canales bovinas con el objetivo de identificar a nivel de estas defectos menores o mayores. Algunos de los defectos identificados mediante inspección visual son: presencia de coágulos, hematomas, heces, lesiones y pelos (Varga Zambrano & Aguilar Galvez,2015).

La carga bacteriana inicial en canales surge de su contaminación durante el sacrificio, posterior a su eviscerado y previo a la realización del lavado, desinfectado y refrigeración . La contaminación inicial de las carcasas se verá influida por los propios animales faenados, los trabajadores y ambiente circundante incidiendo en el grado de contaminación final de la carne (Varga Zambrano & Aguilar Galvez,2015).

De las múltiples fuentes de contaminación a las que están expuestas las carcasas durante la faena, la presencia de pelo es considerado el principal origen de la contaminación con STEC (Barkocy-Gallagher et al., 2003; Brichta-Harhay et al., 2007).

Evitar la contaminación de las canales con STEC, así como contar con planes HACCP, buenas prácticas de manufactura que incluyan la aplicación de intervenciones antimicrobianas contribuyen a disminuir la presencia de esta bacteria (Brusa et al., 2020).

Las principales intervenciones antimicrobianas que pueden realizarse en canales para descontaminarla de STEC y otros, se basan en la aplicación vapor en superficie y ácidos como el láctico o acético (Brusa et al., 2020).

La técnica y o tipo de sacrificio animal realizado, influye en estado microbiológico de las carcasas.(Buenas prácticas escritorio)

La faena del tipo ritual como la Kosher, se realiza mediante una incisión a nivel de la vena yugular, sin previa insensibilización animal. Este tipo de sacrificio genera que el animal se desangre, contaminando de este modo la superficie de la canal y contribuyendo a que el descenso de pH a nivel muscular no sea suficiente para alcanzar protección acida (Chaín, Forconesi, Eguizamón y Weintein, 2010).

El pH alcanzado a nivel muscular en sacrificios como el Kosher oscila entre 5,8-6,2, lo que implicara un mayor recuento microbiológico a nivel de la carne (Chaín et al., 2010).

No se encontró información que vincule una mayor prevalencia de *stx* en canales

bovinas en relación al tipo de establecimiento de faena, aunque cabe destacar que la gran mayoría de los frigoríficos de abasto uruguayos declaran que no aplican intervenciones antimicrobianas, el cual es un factor determinante en la prevalencia como ya se mencionó (comunicación personal María de la Paz Xavier).

### **3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA HIPOTESIS Y OBJETIVOS**

Uruguay es un país de tradición Agropecuaria, siendo la producción cárnica una de sus principales fuentes de divisas debido tanto al consumo local como a su exportación.

Hoy en día la inocuidad alimentaria juega un rol clave en la comercialización de alimentos tanto a nivel nacional como internacional. La ausencia de la misma se traduce no solo en pérdidas económicas tanto para los productores, intermediarios, y exportadores, sino que también posiciona al país con un determinado estatus sanitario que le otorgara o no confiabilidad para los compradores.

Uno de los principales microorganismos causante de rechazo en productos cárnicos, es la presencia de *Escherichia coli* productora de toxina Shiga (STEC).

Como se mencionó anteriormente STEC es capaz de generar enfermedad en humanos a dosis infectivas bajas, desarrollando cuadros gastrointestinales leves o severos, con lesión renal en niños menores de cinco años de edad.

En el año 2017 hubo once alertas en el portal RASFF en productos cárnicos nacionales exportados a Europa debido a la presencia de STEC, tres de ellas correspondían a serotipos asociados a enfermedad severa en niños de nuestro país. En tanto la mercadería considerada peligrosa debido a la presencia de esta bacteria puede ser destruida en destino o devuelta a su país de origen.

Es llamativo que Uruguay, uno de los países exportadores de carne bovina con uno de los mejores estatus sanitarios, a nivel mundial, permitiéndole de esta manera comercializar este producto en más de 140 países, no cuente con información sobre la prevalencia de genes *stx* ni STEC en canales bovinas a diferencia de otros países de la región como Argentina y Brasil.

Por consiguiente, es necesario generar información que nos permita evaluar la situación nacional respecto a la presencia de este microorganismo en canales bovinas a nivel de plantas de faena. Esto permitirá, evaluar la eficiencia de las medidas implementadas por la industria cárnica para controlar y prevenir la presencia de STEC e incluso determinar la influencia de algunos factores tanto animales como de manejo capaces de incidir en su aparición.

### 3.1 Hipótesis

*Escherichia coli* productor de toxina Shiga (STEC) y sus genes definitorios (*stx*) están presentes en 1/2 canales ubicadas en las cámaras de enfriamiento uruguayas y su presencia varía en función de variables como: tipo de frigorífico, época del año de la faena, tipo de animal, tipo de alimentación previa, tipo de faena e intervenciones antimicrobianas.

### 3.2 Objetivo general:

Determinar la prevalencia de genes *stx* y *Escherichia coli* productor de toxina Shiga (STEC) en canales bovinas uruguayas y su asociación con factores de producción.

### 3.3 Objetivos específicos:

- Establecer la prevalencia de genes *stx* y STEC en canales bovinas a nivel de la cámara de maduración de frigoríficos destinados a abasto y exportación .
- Comprobar si el tipo de alimentación animal influye en la prevalencia de genes *stx* en canales bovinas.
- Determinar si la época del año en la cual se realiza la faena influye en la prevalencia de genes *stx* y STEC en canales bovinas.
- Determinar si la categoría animal influye en la prevalencia genes *stx* y STEC en canales Bovinas.
- Determinar si el tipo de frigorífico influye en la prevalencia de genes *stx* y STEC en canales bovinas.
- Determinar si la aplicación de intervenciones antimicrobianas sobre las medias canales bovinas influyen en la prevalencia de *stx* y STEC
- Determinar si la presencia de pelos a nivel de las medias canales bovinas influye en la prevalencia de *stx* y STEC.
- Determinar si el tipo de sacrificio empleado sobre los animales influye en la prevalencia de *stx* y STEC en medias canales bovinas.

## 4. Materiales y Métodos:

### 4.1 Muestreo:

Las unidades de análisis fueron las medias canales. El tamaño muestral se calculó asumiendo que Uruguay dispone de 12 millones de cabezas de ganado bovino y que la prevalencia de genes *stx* se encontraría entre un 15- 20% , con intervalo de confianza del 95 % y un error de 3%, estableciéndose de este modo un n= 800.

El muestreo fue de tipo estratificado, separando las muestras en segmentos exclusivos según si fueron tomadas en frigoríficos de abasto o exportación.

Las muestras de cada estrato se seleccionaron de manera aleatoria a nivel de la cámara de maduración, con reposición y asignación proporcional según número de animales faenados en base a datos provenientes de la División de industria animal (MGAP).

Las muestras fueron obtenidas a partir de 37 frigoríficos (13 de abasto y 24 de exportación), representando el 88 % de los frigoríficos habilitados para la realización de faena bovina en el año 2018. El periodo de muestreo fue entre agosto del 2018 y Julio 2020, incluyéndose en este periodo dos estaciones cálidas y dos frías.

El criterio empleado para la selección de los 37 frigoríficos para completar las 800 muestras se basó en la faena mensual de cada establecimiento y si abastecían al mercado local o eran del tipo exportador.

Se analizaron 800 muestras, de las cuales 63 (7,9%) provinieron de frigoríficos de abasto y 737 (92,1%) de frigoríficos exportadores (estos también abastecen el mercado local). El número de muestras que aportó cada frigorífico fue proporcional a la faena realizada.

Las mismas estaban conformadas por animales de todas las categorías, procedentes de establecimientos con sistemas de alimentación (corral o pasto). Las mismas fueron tomadas en diferentes momentos del año (meses cálidos o fríos), conformadas por animales de todas las categorías (toro, novillo, ternero, vaca, vaquillona), sacrificadas mediante faena convencional o ritual, pudiendo haber recibido o no alguna intervención antimicrobiana. Cabe destacar que las muestras podían contar con observaciones que eran evaluadas de manera visual, registrándose la presencia de pelos o su ausencia.

Se definieron como muestras positivas, aquellas que contaban con genes *stx* a nivel de caldo (primer tamizaje) y positivas para STEC cuando la zona de descarga mostró resultado positivo para los genes *stx*1 y 2 solos o en combinación.

El muestreo fue realizado por funcionarios de INIA e INAC en frigoríficos de 14 departamentos (Artigas, Canelones, Cerro Largo, Colonia, Durazno, Flores, Lavalleja, Maldonado, Paysandú, Rocha, San José, Salto, Soriano, Tacuarembó)

Las muestras de las medias canales seleccionadas aleatoriamente fueron tomadas 24 horas posterior al sacrificio, encontrándose enfriadas a 4°C.

La toma de las muestras se realizó mediante el pasaje de esponja estéril Whirlpak, que fueron puestas en contacto con la superficie total de las medias canales comprendiendo cara externa e interna, según metodología descrita por Brusa y et al.,(2020).

Las esponjas fueron colocadas en bolsa estéril Whirl-Pak, se rotularon con la información necesaria para seguir su trazabilidad, indicándose número de muestra, código de la planta, tipo de alimentación del animal sacrificado y fecha del muestreo. Posteriormente fueron almacenadas en cajas isotérmicas con refrigerante y enviadas al Laboratorio Tecnológico del Uruguay para su procesamiento, acompañadas de una planilla con información detallada de la muestra, incluyendo: categoría animal, tipo de faena realizada, intervención efectuada, lado de la canal y observaciones.

El número de muestras analizadas fue de 800, obtenidas en 97 visitas en las cuales se obtuvieron datos de cada uno de los animales mediante inspección visual.

Los datos registrados fueron: número de dientes del animal faenado, categoría animal (novillos, toro, vaca, vaquillona), tipo de alimentación (corral o pasto), aplicación de intervenciones antimicrobianas posterior al sacrificio (steam vacuum o ácido láctico), presencia de pelos visibles, tipo de faena (Kosher o clásica), tipo de frigorífico muestreado (exportación o abasto) y estacionalidad del sacrificio animal (meses cálidos o fríos).

Cabe destacar que la estacionalidad indicada como cálida corresponde al periodo comprendido entre el primero de octubre al 31 de marzo, mientras que la estacionalidad fría comprende desde el primero de abril al 30 de setiembre.

Los datos recabados fueron analizados para evaluar si estos influían en la prevalencia tanto de genes *stx* como de STEC.

## **4.2 Recepción de las muestras:**

Una vez que las muestras fueron recepcionadas se refrigeraron por un periodo que no excediera las 24 horas desde la toma, a su vez fueron ingresadas en planilla interna del laboratorio y se le asignaron un número correlativo para su seguimiento.

## 4.3 Procesamiento de las muestras:

### 4.3.1 Enriquecimiento:

Las esponjas fueron hidratadas mediante el agregado de 100 ml de medio mTSB (Modified Tryptone Soy Broth) previamente termostatizado en baño a 45°C. Las esponjas con el medio fueron “masajeadas” para permitir que su totalidad tomara contacto con el medio ( Figura 7).



Figura 7. Esponja empleada para la toma de muestra de una media canal, sumergida en medio mTSB.

Posteriormente fueron incubadas en aerobiosis durante 18- 22 horas a  $42 \pm 1$  °C.

### 4.3.2 Primer tamizaje de las muestras:

A partir de los caldos obtenidos, se realizó un tamizaje inicial para detectar los positivos a la presentación de los genes *stx* y *eae*. Esto se realizó mediante PCR en tiempo real, utilizando como molde el ADN extraído mediante la lisis de los todos los caldos de manera individual (800) preincubados empleando cebadores universales para los genes *stx* y *eae*.

### 4.3.3 Extracción de ADN/ Lisis:

La extracción de ADN para realizar el tamizaje se llevó a cabo según las especificaciones del fabricante tomando 30 microlitros de cada caldo enriquecido y colocándolos en un tubo eppendorf junto con 200 microlitros de solución de lisis System Lysis ® Buffer adicionado con el kit Bax® System Proteasa (DuPont, USA).

Cada tubo fue colocado en termobloque a 37°C durante veinte minutos, seguido de otra incubación a 96°C durante diez minutos. Finalizado este tiempo se colocaron

a 4 °C en plancha de frio durante cinco minutos y posteriormente se separó el sedimento del sobrenadante por centrifugación, utilizando este último como molde para realizar PCR en tiempo real.

#### 4.3.4 Reacción en cadena de la Polimerasa:

Se realizo PCR tiempo real para determinar la presencia de genes *stx* y *eae* empleando el kit comercial “STEC Screening *stx/eae*” (DuPont®) en el equipo Bax® System Q7 (DuPont).

En los caldos positivos para genes *stx* y *eae* se realizó la detección de los genes que codifican para O157 y H7 por PCR en tiempo real empleando el kit comercial en el equipo Bax® System Q7 (DuPont). En caso de que los caldos resultaran positivos (+/+ o +/-), se realizó separación inmunomagnética empleando el kit comercial Dynabeads® anti-E. coli O157 y luego siembra en medio cromogenico y CT-SMAC.

Las colonias positivas sospechosas (Sorbitol negativas en CT- SMAC de color malva en medio cromogénico) ver Figura 8, fueron aglutinadas con el kit comercial “*E.coli* O157 Látex Test Kit” para la detección del antígeno O157.

En tanto a los caldos positivos únicamente al gen *stx*, fueron sembrados por agotamiento en medio Mac Conkey y Levine.

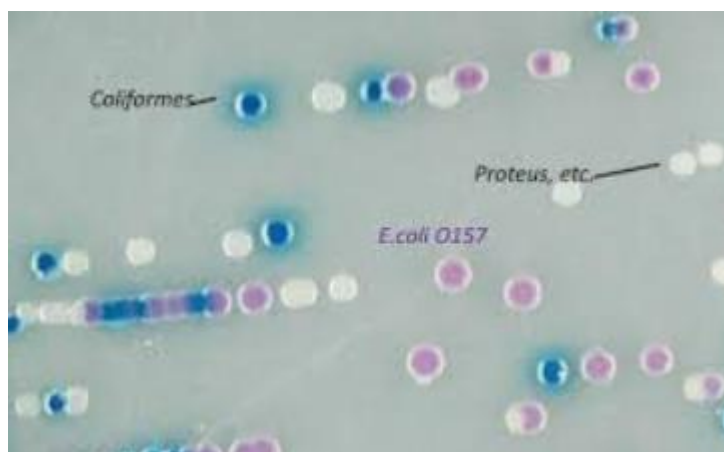


Figura 8. Aspecto de colonias de coliformes, *E. coli* O157 y *Proteus* en medio cromogénico

#### 4.3.5 Aislamiento

Los caldos positivos a los genes *stx*, fueron sembrados por agotamiento en cuatro placas, dos con medio MacConkey y dos con medio EMB- Levine.



Las cuatro placas fueron rotuladas con el número de caldo positivo y cada una dividida en seis partes iguales.

Para la siembra se colocó 1 ml de los caldos enriquecidos en tubo eppendorf y se centrifugo a máxima velocidad durante cinco minutos para obtener el sedimento bacteriano.

Con ansa estéril se desorganizó el sedimento obtenido y se sembró una de las seis partes de cada una de las dos placas que contaba con el medio MacConkey obteniéndose así una zona de descarga.

Tomando otra ansa estéril se tocó la zona de descarga y se sembró desde esta hacia la zona siguiente en sentido horario. Utilizando esta misma ansa se sembró sucesivamente la totalidad de las partes hasta completar la superficie de placa y se continuó sembrando con esta ansa la totalidad de las placas de manera alternada continuando con las de medio Levine.

El objetivo fue obtener el mayor número de colonias aisladas para poder estudiarlas individualmente.

Las placas sembradas fueron conservadas a 4°C para su posterior procesamiento.

Luego de sembradas las cuatro placas, se colocaron en estufa de 37°C durante 24 horas. (Figura 9) (Figura 10).

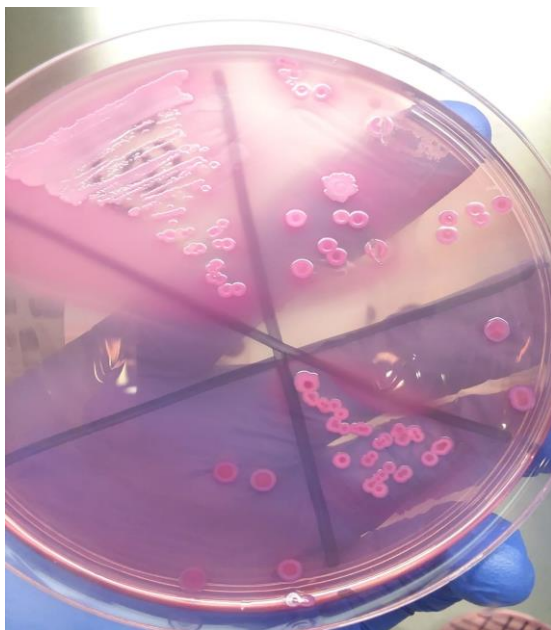


Figura 9. Placa sembrada por agotamiento en medio MacConkey. Se evidencia la zona de descarga y sus colonias Lactosa positiva con morfología típica.

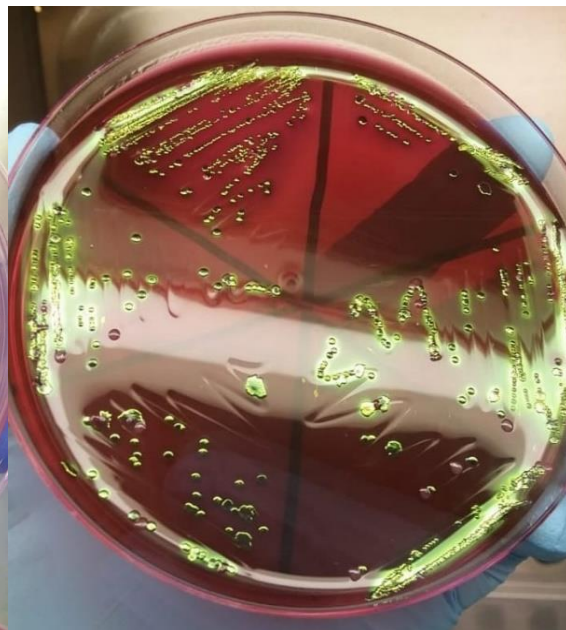


Figura 10. Placa sembrada por agotamiento en medio Levine. Se aprecia la coloración verdosa característica de *E.coli* en medio cromógeno.

#### **4.3.6 Extracción de ADN de la Zona de descarga:**

Una vez que se obtuvo buen crecimiento en las placas, con ansa estéril se tomó parte de la zona de descarga y se incorporó en solución de lisis.

La solución de lisis empleada en esta etapa estaba conformada por 150  $\mu$ l de TRIS EDTA 1X y Tritón X 100 al 1 %.

Cada tubo de lisis contenía 150  $\mu$ l de solución de lisis a la cual se le incorporó con ansa estéril parte de la zona de descarga y agitó en vortex hasta obtener una suspensión homogénea.

Este tubo se colocó en termo bloque durante cinco minutos a 100 °C, pasado este tiempo se mantuvo a 4 °C durante diez minutos para luego centrifugarse a 12000 rpm por un periodo de 10 minutos para separar el sedimento y el sobrenadante.

El sobrenadante fue colocado y almacenado en un tubo nuevo para ser utilizado en la reacción de PCR.

#### **4.3.7 Reacción en cadena de la polimerasa de la Zona de descarga (Segundo tamizaje):**

La técnica de PCR empleada en esta etapa fue a tiempo final, del tipo multiplex. El objetivo fue identificar el tipo de genes *stx* presentes en la zona de descarga y la presencia del gen *eae*.

En la reacción se utilizó la mezcla comercial de Taq polimerasa y nucleótidos denominada Ranger Mix. Esta es una enzima Hot start combinada con nucleótidos, cloruro de magnesio y potenciadores de la reacción de amplificación.

Se emplearon tres pares de cebadores para amplificar los genes: *stx1*, *stx2* y *eae*. Como control positivo se utilizó la cepa ATCC 43895 la cual cuenta con los tres genes buscados y como control negativo se empleó agua de calidad molecular (Baschera et al., 2019)

Para realizar la reacción de PCR en un volumen final de 25  $\mu$ l por tubo se emplearon 12,5  $\mu$ l de ranger mix partiendo de una concentración stock de 2x 1,5 $\mu$ l de cada uno de los cebadores partiendo de una solución stock con una concentración 10  $\mu$ M, 8  $\mu$ l de agua y 3  $\mu$ l de ADN molde.

Las secuencias de cebadores empleados para la reacción de PCR, así como las temperaturas de annealing y el tamaño de los amplicones obtenidos se detallan en el cuadro III.

Cuadro III. Cebadores utilizados para la identificación de genes *stx* y *eae* en cepas *E. coli*

Gen	Cebadores	Secuencia nucleotídica	Temperatura de Annealing	Tamaño del Amplicon
<b><i>stx1</i></b>	Stx1 Forward	ATAAATCGCCATTCGTTGACTAC	65°C	180 pb
	Sxt1 Reverse	AGAACGCCCACTGAGATCATC		
<b><i>stx2</i></b>	Stx2 Forward	GGCACTGTCTGAAACTGCTCC		255 pb
	Stx2 Reverse	TCGCCAGTTATCTGACATTCTG		
<b><i>eae</i></b>	Eae Forward	GACCCGGCACAAGCATAAGC		384 pb
	Eae Reverse	CCACCTGCAGCAACAAGAGG		

Una vez incorporado el ADN de las muestras a la mezcla de reacción, se colocó en el termociclador T100 Thermal Cycler de Biorad .

El programa utilizado para la amplificación del ADN consto de una etapa de desnaturalización inicial a 95 °C durante 15 minutos, seguido de pasos repetidos en orden durante 35 ciclos.

Las temperaturas empleadas, así como el número de ciclos de las diferentes etapas se describen a continuación (Cuadro IV).

Cuadro IV. Programa de PCR utilizado para la amplificación del ADN, se detallan números de ciclos y temperaturas correspondientes.

95 ° C	15 minutos
--------	------------

95 ° C	1 minuto	<b>10 ciclos</b>
65°C	2 minutos	
72°C	1 minuto 30 segundos	

95 ° C	1 minuto	<b>4 ciclos</b>
64°C	2 minutos	
72°C	1 minuto 30 segundos	

95 ° C	1 minuto	<b>10 ciclos</b>
60°C	2 minutos	
72°C	1 minuto 30 segundos	

95 ° C	1 minuto	<b>11 ciclos</b>
60°C	2 minutos	
72°C	minuto 30 segundos	

### 4.3.8 Electroforesis

Los productos de PCR fueron separados en geles de agarosa al 2%, para evidenciar los genes presentes en la zona de descarga.

Se realizó una tinción incorporada con gel red, adicionando 10 ul cada 100 ml (10%) y se corrió durante 55 minutos a 90 V y a 57 amperes. Finalizados los 55 minutos el gel se realizó la lectura e interpretación bajo luz UV (Figura 11.)

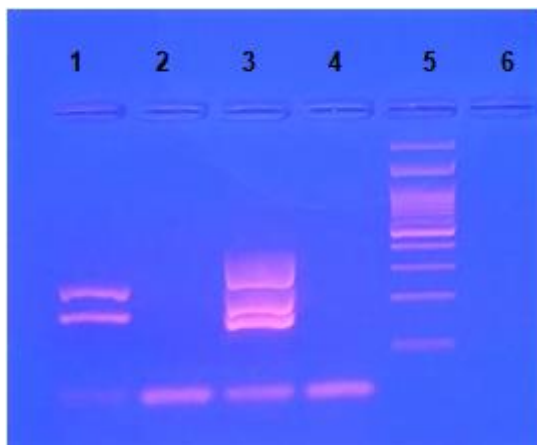


Figura 11. Detección de genes *stx* mediante PCR y electroforesis en gel de agarosa al 2% a nivel de zona de descarga. Carril 1: Descarga positiva a genes *stx1*(180 pb) y *stx2*(255 pb); carril 2,4: descargas negativas a genes *stx*; carril 3: cepa control positivo a genes *stx1*, *stx2* y *eae*; carril 5: marcador de peso molecular con un rango de 100 pb -1013 pb; carril 6: control negativo.

Las muestras que presentaron una zona de descarga con genes *stx1*, *stx2* o ambos continuaron su procesamiento, aislándose 50 colonias a partir de los cuatros placas sembradas como se mencionó en el punto **4.3.5**

### 4.3.9. Aislamiento de colonias

Se estudiaron hasta 50 colonias de las muestras positivas a genes *stx* en la zona de descarga. Para esto se empleó una placa con medio MacConkey y se dividió en 50 cuadrantes, cada uno empleado para el sembrado de una colonia tomada de las placas anteriores de MacConkey y Levine.

Partiendo de los cuatros placas cultivadas mencionadas en el punto **4.3.5**, se tomó con ansa estéril una colonia aislada característica de cualquiera de las cuatro placas y se sembró en una de las 50 reparticiones que contaba la placa con medio MacConkey. Este proceso se repitió 50 veces hasta completar la totalidad de la placa, cabe destacar que en cada uno del cuadrante se sembraron colonias distintas.

Una vez realizado el sembrado, se colocó en estufa de incubación a 37 °C durante 24 horas.

Pasadas las 24 horas, las placas con las 50 colonias crecidas fueron identificada de la siguiente manera: a la cara externa de la placa, la cual se encontraba dividida en cuadrantes se le asigno un número del 1 al 50 de manera correlativa identificando así cada una de las colonias con un numero individual (Figura 12).

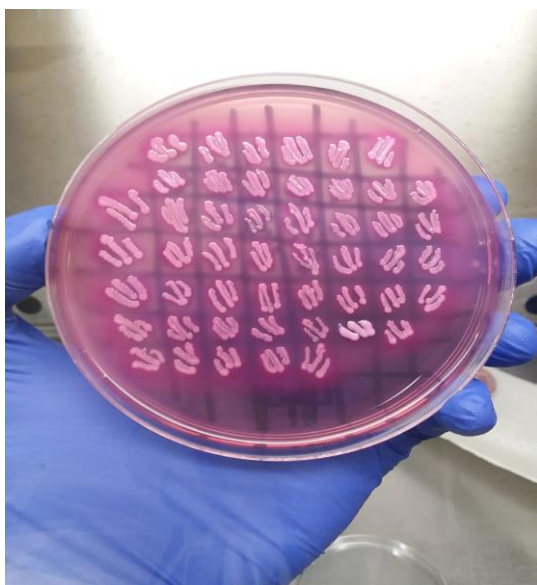


Figura 12. Se observan cincuenta colonias lactosa positivas sembradas en medio MacConkey.

Posterior a el aislamiento se realizó PCR de tiempo final de las colonias organizada en pooles. Para cada muestra se hicieron hasta 5 pooles conformados por 10 colonias cada uno.

#### **4.3.10 Extracción de ADN de los Pooles**

La extracción de ADN de los pooles se realizó con la misma solución de lisis e igual metodología del punto **4.3.6**

#### **4.3.11 Reacción en cadena de la polimerasa de los pooles:**

La técnica de PCR empleada en esta etapa, tipo y concentración de los reactivos empleados, así como la interpretación de los resultados mediante electroforesis es la descrita previamente en los puntos **4.3.7** y **4. 3.8**.

El objetivo fue identificar tanto la presencia como el tipo de genes *stx* y la existencia del gen *eae* en cada uno de los 5 pools de la placa.

#### **4.3.12 Interpretación de los Resultados / Electroforesis:**

Los productos de PCR de los pools fueron interpretados mediante la realización de una corrida electroforética en gel de agarosa con posterior lectura e interpretación bajo luz UV.

La concentración de la agarosa empleada para la elaboración del gel, así como las condiciones de corrida son las mismas descritas en el punto **4.3.8**.

Una vez interpretados los resultados, a partir de los pools que fueron positivos a la presencia de genes *stx* se realizó PCR de cada una de las colonias que integraban el pool de manera individual.

Cabe destacar que no se utilizaron todos los pools positivos para realizar PCR de las colonias, sino que previo a esto se realizó una selección de los pools.

La selección se basó en el tipo de genes que presentaba el pool, es decir si dos pools presentaban la misma combinación de genes se seleccionaba solo uno. Las posibles combinaciones de genes que se podían presentar fueron las siguientes: ***stx1*** o ***stx2*** de manera individual, ***stx1 + eae***, ***stx2+ eae***, ***stx1+ stx2+ eae***, y ***eae*** sin presencia de genes *stx*.

El objetivo de esta selección fue el de lograr aislar colonias con perfiles genéticos diferentes.

Debe señalarse que a las colonias de los pools que presentaban únicamente genes *eae* no se les realizó PCR, ya que su estudio no se encontraba dentro de la finalidad de este trabajo.

Una vez seleccionados los pools, se realizó PCR individual de las diez colonias que integraba cada uno de los pools. Para esto se utilizaron las placas sembradas en medio MacConkey que contaban con las 50 colonias distribuidas en 5 pools.

#### **4.3.13 Extracción de ADN de las colonias:**

La extracción de ADN de las colonias se realizó con la misma solución de lisis e igual metodología del punto **4.3.6**. Por cada pool se utilizaron diez tubos uno por cada colonia, obteniendo de este modo el ADN de cada una de manera individual.

Para esto se utilizaron las placas sembradas en el punto 4 y con ansa estéril se tomó parte de una colonia perteneciente al pool seleccionado, se disgregó en la solución de lisis y se rotuló el tubo para identificar la colonia. Este procedimiento se repitió 10 veces por pool seleccionado.

#### **4.3.14 Reacción en cadena de la Polimerasa:**

La técnica de PCR empleada en esta etapa, tipo y concentración de los reactivos empleados, así como la interpretación de los resultados mediante electroforesis es la ya descrita en los puntos **4.3.7** y **4.3.8**.

El objetivo fue identificar los genes *stx* que contaban las colonias aisladas, así como la presencia del gen *eae*.

#### **4.3.15 Interpretación de los Resultados / Electroforesis:**

Los productos de PCR de las colonias fueron interpretados mediante la realización de una corrida electroforética en gel de agarosa con posterior lectura e interpretación bajo luz UV.

La concentración de la agarosa empleada para la elaboración del gel, así como las condiciones de corrida son las mismas descritas en el punto **4.3.8**.

Las colonias positivas, fueron reaisladas para ser congeladas posteriormente y generar así un cepario de colonias con presencia de genes *stx*.

#### **4.3.16 Reaislamiento de Colonias *stx* positivas:**

Las colonias positivas a los genes *stx* fueron realizadas a partir de la placa con medio MacConkey utilizada para realizar tanto PCR de los pooles y de las colonias.

Para esto con ansa estéril se tomó parte de una colonia positiva y se sembró en medio TSA (Tryptosa soya Agar), se colocó en estufa de incubación a 37°C overnight.

#### **4.3.17 Identificación Bioquímica:**

Una vez sembrada la placa de medio TSA con la colonia positiva, se realizó la prueba de indol como tamizaje, ya que el 99% de las cepas de *Escherichia coli* son indol positivas.

La prueba de indol fue realizada mediante el kit comercial, RapidID™ Spot Indole Reagent.



Las bacterias Indol positivas fueron almacenadas en ultrafreezer, para su preservación y posterior caracterización e identificación mediante Maldi-Tof en algunos casos y secuenciación completa de genoma (WGS).

#### **4.4 Crio preservación de las cepas Aisladas:**

Las cepas cultivadas overnight e identificadas como indol positivas se almacenaron a en crioviales en freezer de  $-80^{\circ}\text{C}$ . Este procedimiento se basó en la toma de la totalidad de la placa sembrada con ansa estéril e incorporarla en criotubos también estériles que contaban con medio TSB combinado con glicerol en una proporción 70-30.

Los tubos fueron debidamente rotulados, incluyendo: Fecha de congelación, numero de caldo y colonia.

#### **4.5 Análisis estadístico**

Para el análisis estadístico de los datos generados a nivel de laboratorio y los de las variables estudiadas se realizaron pruebas Chi- cuadrado, test de Fisher y regresión logística, utilizando los procedimientos FREQ y CATMOD del programa estadístico “Statistical Analysis System “(versión 9.4).

Se realizaron análisis del tipo descriptivos e inferenciales. Los análisis descriptivos aportan información sobre la distribución de las muestras según tipo de frigorífico, estacionalidad, tipo de alimentación, tipo de faena y categoría animal .

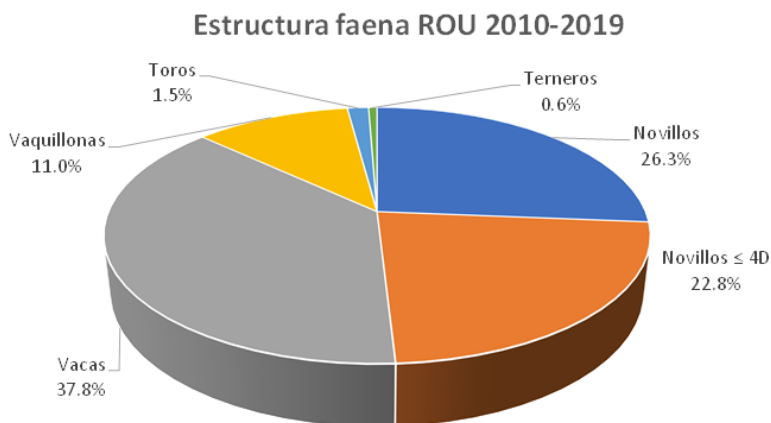
Los análisis inferenciales aportaron información sobre la influencia de diferentes factores (tipo de animal, tipo de alimentación, tipo de frigorífico, época de la faena, intervenciones, presencia de pelos) en función de prevalencia de genes *stx* a nivel de caldo de manera independiente (Chi- cuadrado, test de Fisher) y en combinación (análisis multivariado).

## 5. Resultados:

### 5.1 Análisis descriptivos del Muestreo:

#### 5.1.2 Distribución de las Muestras:

El número total de muestras se distribuyó según la categoría de los animales faenados, con una pequeña diferencia en relación a la faena nacional: Novillo 58,8%, Vacas 24,5%, Vaquillonas 16,0%, Toros 0,5%, Terneros 0,1%. (Figura 13), (Figura 14)



Fuente: Anuario INAC 2019.

Figura 13. Distribución de la faena nacional en función de la categoría animal (2010-2019)

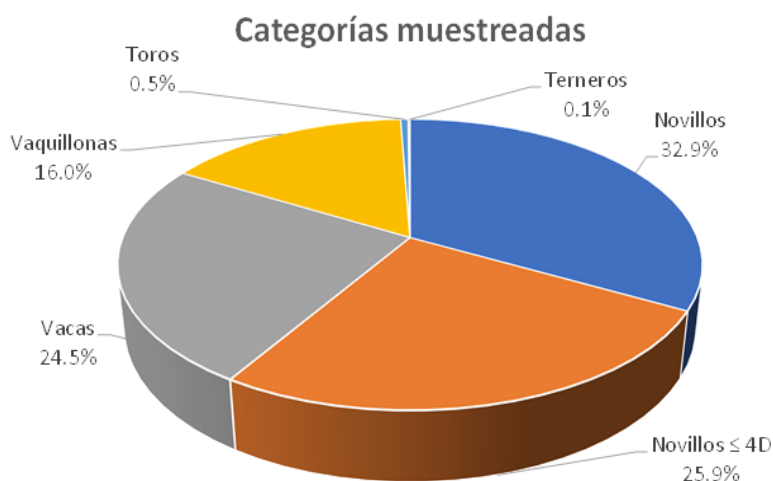


Figura 14. Distribución de las muestras en función de la categoría animal (2018- 2020)

Las muestras se obtuvieron de dos tipos de frigoríficos, los que atienden el mercado local (abasto) y los habilitados para exportación, aunque estos últimos también abastecen a nivel nacional.

Los 37 frigoríficos seleccionados se conformaron por 13 de abasto y 24 de exportación, aportando respectivamente un 8% y 92 % de las muestras analizadas.

La distribución de las medias canales según categoría animal en función del tipo de frigorífico fue de la siguiente manera (figura 15)

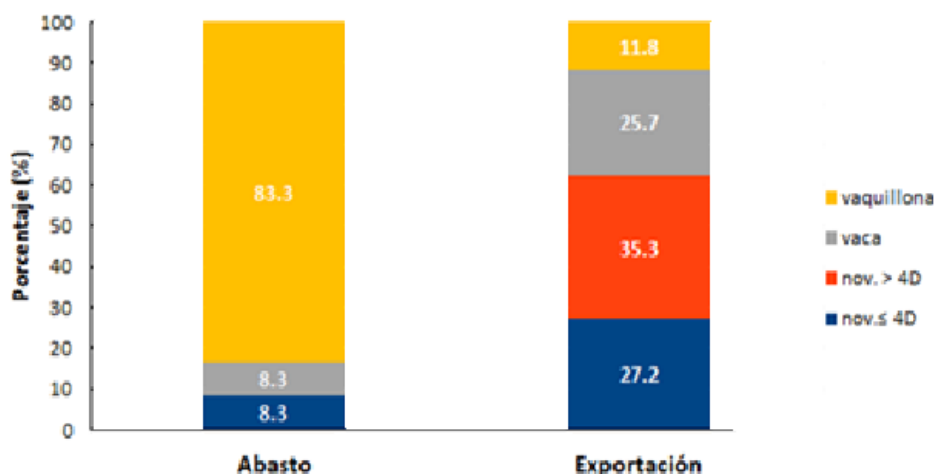


Figura 15. Distribución de la categoría animal de las medias canales en Frigoríficos de abasto y exportación.

La distribución de las medias canales muestreadas de cada categoría animal en función de la estacionalidad se muestran en la (figura 16).

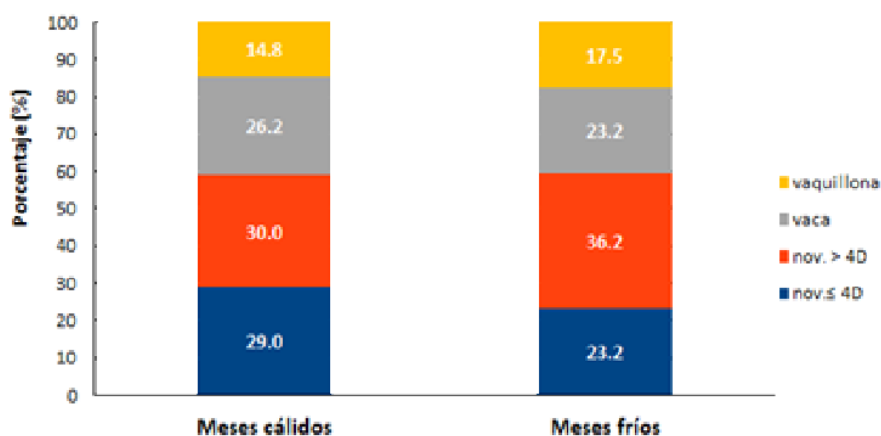


Figura 16. Distribución de las medias canales en función de la estacionalidad.

En relación al sistema de alimentación del cual provenían las medias canales, se estableció que del total de las muestras el 89% correspondía a animales alimentados a pasto y 11% a corral.

Se determinó que la presencia de genes *stx* provenientes de medias canales de frigoríficos de abasto y exportación a nivel de caldo fue de 22,3%, representando 179 medias canales. La prevalencia de STEC (Señal positiva en la zona de descarga) fue de 18,5 % (148 medias canales positivas para genes *stx*) y la tasa de recuperación de STEC fue del 5%.

## 5.2 Análisis inferencial

En relación a los frigoríficos de exportación muestreados, 20 presentaron en alguna media canal genes *stx* a nivel de caldo, en tanto de los 13 de abasto analizados solo 9 contaron con genes *stx*. Mediante la realización del test estadístico exacto de Fisher no se encontró diferencia significativa  $p= 0,6906$  en el número de frigoríficos de abasto o exportación que presentaban al menos una muestra con genes *stx* a nivel de caldo.

Al realizar el análisis por frigorífico no existen diferencia, sin embargo, el 57% de las carcadas de frigoríficos de abasto fueron positivas a genes *stx* contra el 20% en exportación. Valor del análisis  $\text{Chi}^2 = 47,5942$  con un valor  $p < 0,00001$  significativo con  $p < 0,5$ .

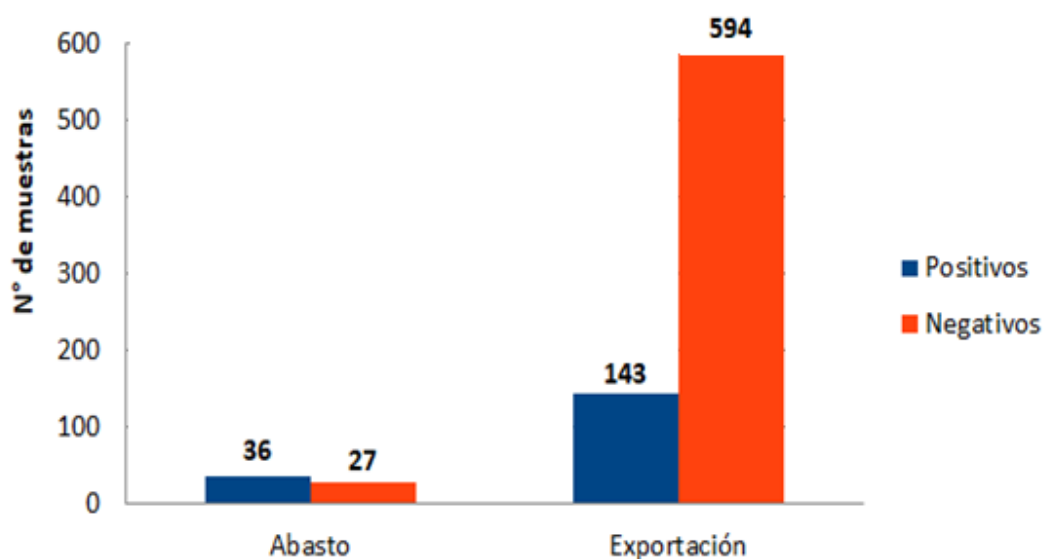


Figura 17. Distribución de caldos positivos y negativos según tipo de frigorífico analizado.

Para la realización de los análisis estadísticos posteriores se usó la prevalencia de genes *stx* (a nivel de caldo “primer tamizaje”) y STEC en zona de descarga (“segundo tamizaje”) como resultados idénticos a pesar de que a nivel de caldo hubo 31 muestras con señal positiva pero negativas en zona de descarga

## 5.2.1 Asociación de factores a la presencia de genes *stx* en caldo

### Categoría animal

Se encontró asociación entre la presencia de caldos positivos para *stx* y categoría animal, expresando un valor  $P= 0,0019$ . En el cuadro v se detalla el porcentaje de animales positivos de cada estrato animal a nivel de caldo.

Cuadro V. Porcentaje de caldos positivos a genes *stx* según categoría animal (toros y terneros no fueron incluidos en el análisis ya que representaban un porcentaje pequeño del muestreo, 0,5 y 0,1, respectivamente).

<b>Categoría Animal</b>	<b>Porcentaje de animales positivos</b>
Vaquillona	34,4
Vaca	16,8
Novillo > 4 dientes	23,2
Novillo ≤ 4 dientes	19,8

### Establecimiento de faena:

Se encontró asociación entre el tipo de frigorífico del cual procedían las muestras y caldos positivos, expresando un valor  $P= 0,0001$ .

En frigoríficos de abasto el 57% de las muestras analizadas fueron positivas para los genes *stx* en caldo, mientras que en los de exportación el porcentaje de positividad fue de 20%.

La presencia de genes *stx* en esta etapa en frigoríficos de abasto fue 6,7 veces mayor en relación a la registrada en los de exportación.

### Tipo de faena

No se encontró asociación entre el tipo de sacrificio realizado en los animales y caldos positivos, contando con un valor  $P= 0,5977$ .

Los animales sacrificados mediante faena convencional presento un 22,1% de positividad en caldo, en tanto a los que se les aplicaron faena tipo Kosher presentaron un 24,7% de muestras positivas.

### **Tipo de alimentación animal**

El sistema de alimentación animal no presentó asociación con la presencia de caldo positivos, expresando un valor  $P= 0,9470$ . En ambos sistemas hubo una positividad del 22%.

### **Estacionalidad**

La estacionalidad del sacrificio animal no presentó asociación con la positividad en caldos, con un valor  $P= 0,1197$ .

### **Aplicación de intervenciones antimicrobianas**

La aplicación de intervenciones antimicrobianas durante el proceso de faena como steam vacuum o uso de ácido láctico presentó asociación con la positividad en caldos, con un valor  $P= 0,0002$ . En los establecimientos que se declaró la aplicación de algún tipo de intervención el porcentaje de positividad a nivel de caldo fue de 18,08, en aquellos que no declararon su uso el porcentaje fue de 29,7.

### **Presencia de pelos en la media canal**

Se encontró asociación entre la presencia de pelos visibles en las medias canales muestreadas y caldos positivos, con un valor  $P= 0,0001$ . El porcentaje de muestras positivas a nivel de caldo fue de 37,6 para las medias canales que presentaron pelos y 16,9 para las carentes de estos.

### **Análisis multivariado - presencia de genes *stx* en caldo**

El análisis multivariado señaló cuáles de las variables estudiadas incidían de manera conjunta sobre la el número de caldos positivos a genes *stx*. A diferencia de los análisis realizados previamente, los cuales identificaron las variables que incidían de manera individual en la prevalencia de genes *stx* en caldo.

Se estableció que, de las variables analizadas, tipo de frigorífico, categoría animal y presencia de pelos influían en el porcentaje de positividad en caldo (Cuadro VI).

Cuadro VI. Resultados del análisis multivariado. En color rojo se destacan las variables que mostraron una asociación significativa ( $P < 0,05$ ) con la presencia de genes *stx*.

Maximum Likelihood Analysis of Variance			
Source	DF	Chi-Square	Pr > ChiSq
Época del año	1	1.40	0.2369
Tipo frigorífico	1	18.48	<.0001
Alimentación	1	0.02	0.8754
Intervención AM	1	3.07	0.0796
Presencia pelos	1	11.54	0.0007
Categoría anim.	3	8.58	0.0354
Dientes	4	4.84	0.3044
Tipo faena	1	0.57	0.4501

### 5.2.2 Presencia de genes *stx* a nivel de zona de descarga:

De las 800 muestras analizadas un 22,3% fue positivo en caldo para genes *stx*.

A partir de los caldos positivos, se evaluó la viabilidad celular través de su aislamiento y posterior estudio molecular a nivel de zona de descarga, discriminando tipo de genes *stx* presentes, y porcentaje de descargas positivas.

De las 179 zonas de descarga evaluados solo 148 fueron positivas a genes *stx*, lo que representa un porcentaje de positividad de 18,5% sobre el total de muestras analizadas.

En la tabla que se muestra a continuación (cuadro VII) se detalla el número de descargas positivas para genes *stx*, Identificándose el porcentaje de zonas de descarga con genes: *stx 1*, *stx2*, *stx1* y *stx2* .

Cuadro VII. Número y porcentaje de descargas positivas a genes stx de manera individual y en combinación.

<b>Gen</b>	<b>Numero de descargas Positivas, N= 148</b>	<b>Porcentaje</b>
<b><i>stx1</i></b>	21	14,2
<b><i>stx2</i></b>	59	39,8
<b><i>stx1 - stx2</i></b>	68	46

### 5.2.3 Colonias STEC recuperadas

A partir de las 800 medias canales analizadas se logró confirmar que un 5% (40 muestras) contaba con colonias de *Echerichia coli* productoras de toxina Shiga de las cuales 2 correspondieron al serotipo O157: H7, provenientes del mismo establecimiento de faena de tipo abasto.



## 6. Discusión

En la etapa de tamizaje de las muestras se estableció por PCR en tiempo real la presencia de genes *stx* a nivel de caldos sembrados con muestras de obtenidas de las carcasas, como indicador de STEC.

La prevalencia global de genes *stx* en etapa de tamizaje a nivel de caldo fue de 22,3%. Este porcentaje es similar al encontrado en Argentina por Brusa et al., 2020, reportando una prevalencia de genes *stx* del 23,1% en medias canales a nivel de frigorífico.

Cabe destacar que este porcentaje de positividad corresponde a frigoríficos que contaban con plan HACCP, al igual que las plantas que participaron de este estudio, no sabemos si los de abasto aplicaban HACCP.

Diferentes fueron los porcentajes de positividad para genes *stx* en medias canales provenientes de frigoríficos argentinos que no contaban con plan HACCP, multiplicando prácticamente por dos la prevalencia. Esto sugiere que la presencia de planes HACCP, y las medidas aplicadas para disminuir los riesgos de aparición del microorganismo son efectivas para disminuir la presencia de genes *stx* y STEC (Brusa et al., 2020).

A nivel nacional la aplicación de plan HACCP es un requisito obligatorio para que los frigoríficos sean habilitados, lo cual podría explicar la prevalencia similar con Argentina.

En Irlanda se realizó un estudio similar con el objetivo de evaluar a nivel de cuero y carcasas bovinas la prevalencia y los serotipos STEC presentes. Los resultados obtenidos mostraron que la prevalencia de genes *stx* en canales bovinas a nivel de caldo representó un 27%. (Monaghan et al., 2012) . Estos resultados difieren en un 5% con los obtenidos en este trabajo, siendo el número de frigoríficos muestreado, periodo de muestreo y técnica molecular empleada para la detección de genes *stx*, algunos de los posibles factores que influyeron en este resultado. Las carcasas evaluadas en Irlanda provinieron únicamente de tres frigoríficos exportadores, esto podría generar efecto negativo a nivel de prevalencias en el caso de no contar con buenas prácticas en el proceso de faena. Por otra parte, para la identificación de genes *stx*, se empleó PCR a tiempo final, presentando una sensibilidad menor al PCR en tiempo real empleado en este trabajo, además de depender de la correcta interpretación de los geles empleados para identificar los productos amplificados. Por otra parte, la prevalencia de genes *stx* a nivel de la zona de descarga (tomada como la presencia de bacterias viables portadoras de los genes *stx*, sobre todo STEC, aunque no exclusivamente) fue del 18.

La disminución de la prevalencia de genes *stx* a nivel de la zona de descarga vs caldo de enriquecimiento se asocia a que a nivel de caldo pueden amplificarse genes *stx* mediante PCR que están presentes en fagos o en células no viables que al utilizarse para ser sembrado en medio MacConkey no logran proliferar y no se detectan en esta etapa. También Cabe destacar que la metodología empleada para la identificación de *stx* en la zona de descargar difiere de la aplicada en caldo, utilizándose PCR en tiempo final pudiendo colaborar en la variación de la prevalencia.

En relación a la prevalencia de STEC, recuperadas e identificadas como tal a nivel de canales bovinas se definió que correspondía al 5%. Este valor fue confirmado mediante aislamiento de colonias que se conservaron para estudios posteriores y solo 2 correspondieron al serotipo O157 H:7. Este resultado coincide con datos de distribución de STEC en casos de SUH con confirmación microbiológica donde O157:H7 no es el serotipo más frecuente recuperado (Schelotto, 2016).

La prevalencia de STEC, 5% es significativamente menor en relación a la prevalencia de genes *stx* en zona de descarga y es aún menor a la obtenida en caldo. Esta variación en la prevalencia determinada previamente puede atribuirse a múltiples factores como lo son las diferentes metodologías empleadas en cada etapa, el número de colonias aislada, estudiadas y a que las señales positivas para los genes *stx* pueden deberse a una o varias bacterias (Cobbold et al., 2004). Para poder identificar cual o cuales de los factores anteriormente mencionado influyen en el descenso de la prevalencia de un 22 % a 5%, sería necesario aplicar la misma metodología para la detección de genes *stx* en todas las etapas del proceso y evaluar el número de colonias que debería aislarse para determinar si las 50 colonias aisladas por muestra fue un número suficiente.

La disminución de la prevalencia desde la zona de descarga a la colonia STEC aislada puede deberse a el número de colonias repicadas. Este proceso se realizó analizando hasta cincuenta colonias provenientes de zonas de descargas positivas, pudiendo tal vez ser un numero insuficiente de aislamientos impidiendo identificar la o las colonias *stx* positivas.

Los porcentajes de prevalencia tanto en Argentina como en Canadá son similares al obtenido en este estudio. Según (Bohaychuk et al., 2011), en Canadá la prevalencia de STEC en medias canales confirmada mediante aislamiento represento el 5,4 %, en tanto en Argentina el porcentaje osciló entre 5,8 -9% (Brusa et al., 2020).

Los porcentajes de prevalencia de STEC en canales bovinas uruguayas difieren con el encontrado en otros países. Esta situación puede apreciarse en Chile y Estados Unidos, con valores de 28,7%(Borie et al., 1997) y 1,2 respectivamente (Barkocy-Gallagher et al., 2003).

Teniendo en cuenta estos resultados para los análisis de asociación entre la prevalencia de STEC y las variables analizadas decidimos usar el porcentaje de positividad de genes *stx* en los caldos de enriquecimiento como sinónimo de STEC, teniendo en cuenta las limitaciones anteriormente mencionadas.

Una señal positiva en caldo puede corresponder a una STEC o varias o incluso a bacterias diferentes a *E. coli* y a todas las combinaciones posibles de los genes estudiados por PCR en tiempo real.

Se evaluó si la prevalencia de *stx* se veía influida por la estacionalidad del sacrificio animal, no encontrándose asociación al contar con un p valor de 0,1197. Este resultado difiere con los datos obtenidos por (Barkocy-Gallagher et al., 2003) quien identificó una mayor prevalencia en carcasas bovinas en primavera. En tanto Cobbold y cols informaron que existía asociación entre la prevalencia tanto de STEC (9%) como de genes *stx* (21%), en otoño (p= 0,01) (Donkersgoed et al., 1999), sin embargo, no se sabe si se trata de un efecto estrictamente climático o se relaciona con las prácticas de gestión estacional y los ciclos de producción específicos del hemisferio norte. Se necesitan estudios que analicen el contenido intestinal de los animales previo a la faena (Cobbold et al., 2004).

Al analizar la prevalencia de genes *stx* en función de la categoría animal se concluyó que tanto el sexo como longevidad incidían en esta (p= 0,0019). Las carcasas provenientes de vaquillonas y novillos menores de cuatro años representaron la categoría con mayor número de muestras positivas.

Del Castillo, 2014, evaluó presencia de STEC del tipo O157 a nivel de materia fecal y carcasas, encontrando mayor prevalencia en heces de terneros, pero a nivel de carcasas la prevalencia fue mayor en vaquillonas al igual que en este trabajo. Esta diferencia puede deberse a las categorías seleccionadas para el muestreo, la procedencia de los animales analizados y la metodología empleada. (Del Castillo, 2014). Así mismo los animales muestreados provinieron de 14 de los 19 departamentos del territorio nacional mientras que en el trabajo anteriormente mencionado provenían de nueve provincias diferentes, pudiendo tal vez presentar mayor contaminación de estas categorías en esa distribución geográfica.

Entre los principales motivos por los cuales las categorías novillos y vaquillonas se asocian con una mayor prevalencia de genes *stx*, puede deberse a que estas categorías no presentan con inmunidad tan desarrollada en relación a las demás. Así mismo en las vaquillonas la prevalencia es aún mayor que en novillos, esto puede deberse al tipo de manejo de la categoría.

En relación a la aplicación de intervenciones antimicrobianas se demostró que su aplicación incidía en la disminución de muestras positivas para genes *stx*, presentando un valor p= 0,0002. Este resultado coincide con Rhades quien

menciona que la probabilidad de contaminación de la carcasa a partir de heces animales es muy baja al aplicarse buenas prácticas de faena e intervenciones, no logrando aislar STEC O157:H7 en carcasas de novillos con 5,08% de prevalencia previo a la faena (Rhades, 2017.).

Así mismo (Signorini, et al.2018) evaluó la aplicación de nueve tipos de intervenciones antimicrobianas en canales bovinas en frigoríficos de abasto y exportación, identificando una disminución de genes *stx* posterior a la aplicación de estas ( $P < 0,001$ ) siendo las medidas más efectivas la aplicación de ácido láctico al 2% en combinación con inspexx 200.

Al analizar la prevalencia de *stx* en función del tipo de frigorífico se apreció que este factor influía sobre el número de muestras positivas. En frigoríficos de abasto se identificó una positividad, 6 veces más en relación a los de exportación. Esta situación puede estar relacionada a la ausencia de intervenciones en frigoríficos de abasto, ya que estos declararon en su totalidad que no aplicaban ácido láctico ni steam vacuum a nivel de la media canal. Esto también puede deberse al tipo de animal faenado, ya que en frigoríficos de abasto se faenan en mayor medida vaquillonas en relación a los de exportación que faenan en mayor proporción terneros.

Otra de las variables evaluadas fue la influencia de pelos a nivel de la media canal, asociándose positivamente su presencia con un aumento en la prevalencia de genes *stx* ( $P=0,0001$ ). Este dato coincide con los obtenidos por (Brichta-Harhay et al., 2007) quien determinó que la principal fuente de contaminación de las canales durante su procesamiento es el cuero bovino, identificando a ese nivel una prevalencia de 45-94%. Dentro de este orden de ideas, (Barkocy-Gallagher et al., 2003) recuperó STEC del 5,9% de muestras de materia fecal, 60,6% de cuero y 26% en carcasa. En atención a lo expuesto es de esperar que las carcasas con presencia de pelos cuenten con una prevalencia mayor de genes *stx* y por lo tanto de STEC.

Por otra parte, se evaluó la influencia del sistema de alimentación de los animales en la prevalencia de *stx*, no hallando asociación entre ambos, valor  $p= 0,9470$ . Esta situación coincide con trabajos que evaluaron la presencia de *stx* y STEC en heces como los realizados por (Del Castillo, 2014) ,(Barlow & Mellor, 2010) sostienen que el tipo de alimentación no incide la prevalencia global de *stx*, e incluso en algunos casos sugieren que los animales alimentados con feedlot tienen menor prevalencia de genes *stx* y STEC que los animales criados a campo (Cobbold et al., 2004). Según Smith et al., (2010) los factores de estrés ambiental y nutricional como los cambios de dieta, la gran cantidad de barro y el exceso de humedad en sistemas de alimentación a corral disminuyen la resistencia transitoria de los animales a la colonización por STEC, provocando la excreción y el mantenimiento de una alta prevalencia en los animales en el corral de engorde, discrepando con la información

obtenida en este trabajo.

En relación al tipo de faena animal no se encontró asociación entre esta y la prevalencia de *stx* presentando un valor  $p = 0,05$ . Debe mencionarse que la proporción de animales muestreado provenientes de faena ritual y convencional representan la situación nacional en relación al tipo de sacrificio realizado, pero difiere de manera significativa el número de muestras de cada estrato.

## 7. Conclusiones

Los resultados de este estudio muestran que la prevalencia de genes *stx* y STEC en canales bovinas uruguayas es similar a la comunicada por otros autores de la región o internacionales.

En relación a la prevalencia de genes *stx* en medias canales, el porcentaje global fue de 22,3% similar al encontrado en países de la región, como Argentina.

Se evidencio que el tipo de establecimiento, presencia de pelos, tipo de faena animal, aplicación de medidas de mitigación de la contaminación microbiana y tipo de animal tienen incidencia en la presencia de genes *stx* en medias canales, observándose que en los frigoríficos destinados a abasto más del 50% de las muestras presentaban genes *stx*. Se sospecha que el principal motivo de este alto porcentaje es la ausencia de intervenciones sobre las medias canales y las practicas aplicadas durante el proceso de faena y el tipo de animal faenado vaquillona.

El factor categoría animal tiene efecto sobre la prevalencia de genes, identificándose que en vaquillonas esto sucede en mayor proporción en relación a las demás categorías.

La aplicación de intervenciones sobre las medias canales, así como la presencia de pelos también inciden en la presencia de genes *stx*. Lo que sugiere como se mencionó anteriormente que las buenas prácticas de sacrificio, las condiciones higiénicas tienen un efecto directo sobre la diseminación de la bacteria sobre la superficie animal.

Se concluyo que el tipo de alimentación animal, tipo de faena y la estacionalidad del sacrificio no influyen en la presencia de genes *stx*.

## 8. Implicancias

Los resultados indican que sería aconsejable aplicar medidas de mitigación de la contaminación microbiana en los establecimientos de abasto y validar las medidas declaradas en los establecimientos exportadores. Este trabajo pone de manifiesto la preocupación de la industria cárnica local por valorar la magnitud del problema STEC e identificar prácticas en la cadena productiva que puedan ser mejoradas para disminuir el riesgo de infectarse con STEC y minimizar las pérdidas económicas asociados con este microorganismo.

## 8. Bibliografía

- Aigal, S., Claudinon, J., & Römer, W. (2015). Plasma membrane reorganization: A glycolipid gateway for microbes. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1853(4), 858–871.
- Algorta, G., & Schelotto, F. (2008). Principales grupos de bacilos gramnegativos no exigentes. En *Temas de Bacteriología y Virología Médica* (3ª ed., pp. 315–338). Montevideo: FEFMUR.
- Altekruse, S., Cohen, M., & Swerdlow, L. (1997). Emerging Foodborne Diseases. *Emerging Infectious Diseases*, 3(3), 285–293.
- Antman, J., Geffner, L. P., Piaciola, L., & Rivas, M. (2014). Informe especial: Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) en Argentina, 2010-2013. *Extracto del Boletín Integrado de Vigilancia* (222 - SE 30). Recuperado de [https://bancos.salud.gob.ar/sites/default/files/2018-10/0000000799cnt-2014-08\\_informe-suh.pdf](https://bancos.salud.gob.ar/sites/default/files/2018-10/0000000799cnt-2014-08_informe-suh.pdf)
- Askar, M., Faber, S., Frank, C., Bernard, H., Gilsdorf, A., Fruth, A., ... Werber, D. (2011). Update on the ongoing outbreak of haemolytic uraemic syndrome due to Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Eurosurveillance*, 16(22), 4–6.
- Barkocy-Gallagher, G., Arthur, T., Rivera-Betancourt, M., Nou, X., Shackelford, S., Wheeler, L., & Koochmaraie M. (2003). Seasonal Prevalence of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*, Including O157:H7 and Non-O157 Serotypes, and *Salmonella* in Commercial Beef Processing Plants. *Journal of Food Protection*, 66(11), 1978–1986.
- Barslund, S., Benitez, A., Horacio, P., & Wilka, N. (2007). Síndrome Uremico Hemolitico. *Revista de Posgrado de La Vía Cátedra de Medicina*, 15(5 B), 20.
- Baschera, M., Cernela, N., Stevens, M., Lilijander, A., Jores, J., Corman, M., ...Stephan, R. (2019). Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from fecal samples of African dromedary camels. *One Health*, 7, 100087.
- Batt, C. A. (2014). *Escherichia Coli: Escherichia coli*. En C. A. Batt, & M. L. Tortorello (2014), *Encyclopedia of Food Microbiology* (2ª ed., pp. 688-694). Amsterdam: Academic.
- Belardo, B. (2014). Conocimiento científico y problemas de salud. Una enfermedad emergente en Argentina, el Síndrome Urémico Hemolítico. *Physis*, 24(1), 209-228.
- Biaggini, P. (2007). *Las enterobacterias*. Recuperado de <https://www.cescal.com.ar/wp-content/uploads/2021/08/Baggini.pdf>
- Bintsis, T. (2017). Foodborne pathogens. *AIMS Microbiology*, 3(3), 529–563.
- Blanco, J. (2012). *Escherichia coli* enteroagregativa O104:H4-ST678 productora de Stx2a. ¡Diagnóstico microbiológico ya, de este y otros serotipos de STEC/VTEC! *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 30(2), 84–89.

- Borie, C., Monrea, Z., Guerrero, P., Sanchez, M., Martinez, M., Arellano, C., & Prado, V. (1997). Prevalencia y caracterización de *Escherichia coli* enterohemorrágica aisladas de bovinos y cerdos sanos faenados en Santiago, Chile. *Archivos de medicina veterinaria*, 29(2), 205-212.
- Brichta-Harhay, D., Arthur, T., Bosilevac, J., Guerini, M., Kalchayanand, N., & Koohmaraie, M. (2007). Enumeration of *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef, cattle carcass, hide and faecal samples using direct plating methods. *Journal of Applied Microbiology*, 103(5), 1657–1668. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03405.x>
- Brusa, V., Colello, R., & Galli, L. (2019). *Escherichia coli* productor de toxina Shiga. En N. Stanchi, *Microbiología Veterinaria* (pp. 1066–1073) . Buenos Aires: Inter-Médica.
- Brusa, V., Costa, M., Padola, N., Etcheverría, A., Sampedro, F., Fernandez, P, ...Signorini, L. (2020). Quantitative risk assessment of haemolytic uremic syndrome associated with beef consumption in Argentina. *PLoS ONE*, 15(11), e0242317.
- Burkholderia, P., & Mcveigh, I. (1942). Synthesis of B-Vitamins By Intestinal Bacteria. *Nutrition Reviews*, 1(1), 4–5.
- Caletti, M., Petetta, D., Jaïtt, M., Casaliba, S., & Gimenez, A. (2006). Hemolytic uremic syndrome (HUS): medical and social costs of treatment. *Medicina*, 66 (Suppl 3), 22–26.
- Caprioli, A., Morabito, S., Brugere, H., & Oswald, E. (2005). Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. *Veterinary Research*, 36(5–6), 713–722.
- Chaín, P., Forconesi, V., Eguizamón, M., & Weintein, N. (2010). Valoración del contenido de hierro y sodio , del estado microbiológico y aceptabilidad de la carne vacuna kosher , en la ciudad de Rosario , 2009. *Diaeta*, 28(133), 24–31.
- Cobbold, R., Rice, D., Szymanski, M., Call, D. R., & Hancock, D. D. (2004). Comparison of Shiga-Toxigenic *Escherichia coli* Prevalences among Dairy , Feedlot , and Cow-Calf Herds in Washington State. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(7), 4375–4378.
- Creydt, V., Nuñez, P., Boccoli, J., Silberstein, C., Zotta, E., Goldstein, J., & Ibarra, C. (2006). Papel de la toxina shiga en el síndrome uremico hemolitico. *Medicina*, 66(SUPPL. 3), 11–15.
- Croxen, M., Law, R., Scholz, R., Keeney, K., Wlodarska, M., & Finlay, B. (2013). Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(4), 822–880.
- Deng, W. J. L., Puente, S., Gruenheid, Y., Li, B. A., Vallance, A., Vazquez, J., ... B. B. Finlay. (2004). Dissecting virulence: systematic and functional analyses of a pathogenicity island. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101, 3597-3602.
- Di Pillo, F., & Sotomayor, G. (2017). *Escherichia coli* productora de toxina Shiga (STEC). *Fichas de peligro ACHIPIA* (7), 1-9.
- Di Pillo, F., & Sotomayor, G. (2018). *Escherichia coli* productoras de toxinas Shiga O157 y No O157 en carne bovina, Chile. *Perfil de Riesgo ACHIPIA*, (3), 1-77.



- Donkersgoed, J., Van Graham, T., & Gannon, V. (1999). The prevalence of verotoxins , Escherichia coli O157 : H7 , and Salmonella in the feces and rumen of cattle at processing. *Canadian Veterinary Journal*, 40(5), 332–333.
- Etcheverría, A., Guillermo, A., Alberto, P., & Padola, N. (2013). Síndrome Urémico Hemolítico. El rol del bovino como reservorio de Escherichia coli productores de verocitotoxinas (VTEC). *Archivos latinoamericanos de nefrología pediátrica*, 13(1):000-000.
- Farfan, J., Cantero, L., Vidal, R., Botkin, D., & Torres, A. G. (2011). Long polar fimbriae of enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 bind to extracellular matrix proteins. *Infection and Immunity*, 79(9), 3744–3750.
- Farfán-García, A. E., Ariza-Rojas, C., Vargas-Cárdenas, F. A., & Vargas-Remolina, L. V. (2016). Mecanismos de virulencia de Escherichia coli enteropatógena. *Revista Chilena de Infectología*, 33(4), 438–450.
- Farrokh, C., Jordan, K., Auvray, F., Glass, K., Oppegaard, H., Raynaud, S., ...Cerf, O. (2013). Review of Shiga-toxin-producing Escherichia coli (STEC) and their significance in dairy production. *International Journal of Food Microbiology*, 162(2), 190–212.
- Fegan, N., Vanderlinde, P., Higgs, G., & Desmarchelier, P. (2004). The prevalence and concentration of Escherichia coli O157 in faeces of cattle from different production systems at slaughter. *Journal of Applied Microbiology*, 97(2), 362–370.
- Fiallos López, D., Enriquez, M., & Navarro Ocaña, A. (2018). Caracterización serológica de Escherichia coli en cepas de origen humano. *Portal de la Ciencia*, 14, 41–52.
- Flores, T. G., & Herrera, R. A. R. (2005). Enfermedades transmitidas por alimentos y PCR: prevención y diagnóstico. *Salud Pública de México*, 47(5), 388–390.
- Fonseca, S. S. (2009). Síndrome urémico hemolítico. *Revista médica de Costa Rica y Centroamérica*, 66, 588, 213–217.
- European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control. (2019). The European Union One Health 2018 Zoonoses report. *EFSA Journal*, 17(12), e05926.
- Gyles, C. L. (2007). Shiga toxin-producing Escherichia coli: an overview. *Journal of Animal Science*, 85(suppl\_13), E45-E62.
- Hassan, N. A., Farooqui, A., Khan, A., Yahya, A., & Kazmi, S. (2010). Microbial contamination of raw meat and its environment in retail shops in Karachi, Pakistan. *Journal of Infection in Developing Countries*, 4(6), 382–388.
- Hutt P. B. (1984). Government regulation of the integrity of the food supply. *Annual Review of Nutrition*, 4(1), 21.
- Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria. (s.f.). *Programa Nacional de investigación producción y lana*. Recuperado de <http://www.inia.org.uy/online/site/31583811.php>
- Instituto Nacional de la Carne. (2020). *Anuario estadístico 2020*. Montevideo: INAC.

- Joseph, A., Kurkdjian, P., Rafat, C., & Hertig, A. (2020). Shiga Toxin-Associated Hemolytic Uremic Syndrome: A Narrative Review. *Toxins MDPI*, 12(2), 1–46.
- Kaper, J., & O'Brien, A. (2015). Overview and Historical Perspectives. *Microbiology Spectrum*, 2(6), 2–6
- Kaper, J., Nataro, J., & Mobley, T. (2004). Pathogenic Escherichia coli. *Nature Reviews Microbiology*, 2(2), 123–140.
- Karpman, D., & Ståhl A.-L. (2014). Enterohemorrhagic Escherichia coli Pathogenesis and the Host Response. *Microbiology Spectrum*, 2(5), 1–15.
- Kim, J., Lee, M., & Kim, J. H. (2020). Recent Updates on Outbreaks of Shiga Toxin-Producing Escherichia coli and Its Potential Reservoirs. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 273.
- Kopper, G., Calderón, G., Schneider, S., Domínguez, W., & Gutiérrez, G. (2009). *Enfermedades transmitidas por alimentos y su impacto socioeconómico*. Roma: Fao. Recuperado de <http://www.fao.org/3/a-i0480s.pdf>
- Koutsoumanis, K., Allende, A., Alvarez-Ordoñez, A., Chemaly, M., Davies, R., Cesare, A. De, ... Teresa, M. (2020). Pathogenicity assessment of Shiga toxin-producing Escherichia coli ( STEC ) and the public health risk posed by contamination of food with STEC. *EFSA Journal*, 18(1), e05967.
- Margall, N., Domínguez, Á., Prats, G., & Salleras, L. (1997). Escherichia coli enterohemorrágica. *Revista Española de Salud Pública*, 71(5), 437–443.
- Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca. (2021). *Establecimientos habilitados por la DIA*. Recuperado de <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/bovinos>
- Ministerio de Salud. (2019). *Boletín integrado de vigilancia*, (477), 1-97.
- Murray, P., Rosenthal, K., & Pfaller, M. (2019). *Micrbiología Médica*. Barcelona: Elsevier.
- Nataro, J. P., Steiner, T., & Guerrant, R. L. (2018). Enteroaggregative escherichia coli. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 416(2), 27–50.
- Nataro, J., & Kaper, J. B. (1998). Diarrheagenic Escherichia coli. *Clinical Microbiology Reviews*, 11(1), 142–201.
- Ock, S. T., Ecios, P. R., & Es, Y. V. A. (n.d.). *Anuario estadístico 2020*. Montevideo: INAC.
- Olea, A., Díaz, J., Fuentes, R., Vaquero, A., & García, M. (2012). Foodborne disease outbreaks surveillance in Chile. *Revista Chilena de Infectología*, 29(5), 504–510.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2019). *Anteproyecto de orientaciones para la gestión de brotes biológicos transmitidos por los alimentos*. Roma: FAO.
- Organización Panamericana de la Salud. (n.d.). *Enfermedades transmitidas por alimentos (ETA)*. Recuperado de

[https://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=10836:2015-enfermedades-transmitidas-por-alimentos-eta&Itemid=41432&lang=es#:~:text=Una brote de ETA es,el origen de la enfermedad](https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=10836:2015-enfermedades-transmitidas-por-alimentos-eta&Itemid=41432&lang=es#:~:text=Una brote de ETA es,el origen de la enfermedad)

- Paton J. C., & Paton A. W. (2006). Shiga toxin “goes retro” in human primary kidney cells. *Kidney International*, 70(12), 2049–2051.
- Persad, A. K., & LeJeune, J. T. (2014). Animal Reservoirs of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. *Microbiology Spectrum*, 2(4), 1–14.
- Probert, W. S., McQuaid, C., & Schrader, K. (2014). Isolation and identification of an *Enterobacter cloacae* strain producing a novel subtype of Shiga toxin type 1. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(7), 2346–2351.
- Rhades, C. (s.f.). *Trasmisión y persistencia de E. coli O157:H7 en bovinos* (Tesis de maestría). Universidad Tecnológica Nacional, Rosario.
- Rivero, M. A., Padola, N. L., Etcheverria, A. I., & Parma, A. E. (2004). *Escherichia coli* enterohemorrágica y síndrome urémico hemolítico en Argentina. *Medicina*, 64(4), 352–356.
- Rodríguez-Angeles, M. G. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Publica Mexicana*, 44(5), 464–475.
- Rodríguez Torrens, H., Barreto Argilagos, G., Sedrés Cabrera, M., Bertot Valdés, J., Martínez Sáez, S., & Guevara Viera, G. (2015). Las enfermedades transmitidas por alimentos, un problema sanitario que hereda e incrementa el nuevo milenio. *Revista Electrónica Veterinaria*, 16(8), 1-27.
- Russo T. A., & Johnson J. R. (2000). Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *Journal of Infectious Diseases*, 181(5), 1753–1754.
- Schelotto, F., Varela, G., & Grunberg, J. (s.f.). El Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) en Uruguay. Reflexiones clínicas, familiares y sociales. Aspectos microbiológicos F. *Anales de la ANAV*, 69, 436–438.
- Schelotto, F., & Varela, G. (2015). Síndrome urémico hemolítico en Uruguay. Aspectos microbiológicos y clínicos , aportes para su conocimiento regional. *Revista Facultad de Ciencias de la Salud UDES*, 2(1), 25-30.
- Schü, S. (2011). Shiga Toxin Interaction with Human Intestinal Epithelium. *Toxins*, 3(6), 626–639.
- Silberstein, C., Pistone, V., Gerhardt, E., Núñez, P., & Ibarra, C. (2008). Síndrome urémico hemolítico inducido por *Escherichia coli* enterohemorrágica. *Pediatric Nephrology*, 23(11), 1981–1990.
- Smith, R. P., Paiba, G. A., & Ellis-Iversen, J. (2010). Longitudinal study to investigate VTEC O157 shedding patterns in young cattle. *Research in Veterinary Science*, 88(3), 411–414.

- Varga Zambrano, M., & Aguilar Galvez, F. L. (s.f.). *Evaluación microbiológica de la carne bovina en mercados y camal del Cantón Machala, provincia de El Oro* (Trabajo de titulación). Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias, UTMACH, Machala.
- Vázquez, S. (2020). Caracterización Fenotípica y Genotípica de Cepas de Escherichia Coli Productoras de Toxina Shiga (O157 y No -O157) Provenientes de Alimentos, Ganado y Casos Clínicos. Identificación de Nuevos Bancos Útiles para su Detección y Control (Tesis de doctorado). Universidad de la República, Montevideo.
- Yang, X., Bai, X., Zhang, J., Sun, H., Fu, S., Fan, R., ... Xiong, Y. (2020). Escherichia coli strains producing a novel Shiga toxin 2 subtype circulate in China. *International Journal of Medical Microbiology*, 310(1), 151377.