



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE MEDICINA
PROGRAMA PARA LA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

Caracterización de Escherichia coli productoras de toxina Shiga (STEC) recuperadas de canales bovinas uruguayas

Tesis de doctorado en Ciencias Médicas

Autora: Ing. Alim. MSc. Paula Mussio

Director Académico: Profesor Dr. Gustavo Varela
Tutor de la Especialidad: Dr. Gerardo Leotta

Montevideo, Octubre 2023.

Tesis de Doctorado

Programa de Investigación Biomédica (Pro.In.Bio)

Escuela de Graduados, Facultad de Medicina.

Doctorando: Ing. Alim. MSc. Paula Mussio

Tutor: Profesor Dr. Gustavo Varela

Co-tutor: Dr. Gerardo Leotta

El proyecto de doctorado fue aprobado por el Programa de Investigación Biomédica (Pro.In.Bio) en el año 2018.

La investigación llevada adelante en este doctorado se enmarca en el proyecto *“Prevalencia de Escherichia coli productor de toxina Shiga (STEC) en canales bovinas uruguayas. Distribución de serotipos, pulsotipos y presencia de genes asociados a virulencia en las cepas recuperadas”* financiado por el Fondo Sectorial Innovagro - Inocuidad (convocatoria 2017) de la Agencia Nacional de Investigación e Innovación. El proyecto incluyó una beca de doctorado ANII y para su culminación se contó con una beca de finalización de la Comisión Académica de Posgrado (CAP).

AGRADECIMIENTOS

A mis tutores y a los investigadores que me abrieron sus puertas, compartiendo generosamente sus conocimientos. En particular a Stefano Morabito y su equipo por haberme recibido en su laboratorio en Roma.

A mis compañeros del Departamento de Microbiología del LATU que siempre están ahí aguantando mis “cosas raras” y guardándome plaquitas cuando no voy al laboratorio. A Ana María Maquieira que desde siempre me ha acompañado y apoyado en mi crecimiento personal y profesional.

A todo el grupo que ha trabajado en este proyecto conmigo, en especial a Inés Martínez, amiga y compañera de varias rutas de investigación de Micro.

Al Departamento de Bacteriología y Virología del Instituto de Higiene que me abrió las puertas siempre con buena onda y paciencia.

A mis amigos de la vida y mis hermanas hermosas, por ser todo lo que está bien, todo lo que importa. A Seba, mi amor, y a Brunita, que vendrá con pan abajo del brazo y aguantó mis frustraciones desde adentro.

Y en especial, a mi mamá, que llevaba anotado el título de la tesis en el celu para contarle a la gente de que se trataba. Gracias ma, te extraño siempre.

TABLA DE CONTENIDOS

Índice de Figuras	7
Índice de Tablas	9
1. Resumen	12
2. Introducción	16
2.1. Características generales de <i>Escherichia coli</i>	16
2.2. <i>Escherichia coli</i> productor de toxina Shiga (STEC).....	19
2.3. Métodos para detectar, aislar y caracterizar STEC en el laboratorio.....	19
2.3.1. Cultivo celular.....	21
2.3.2. Métodos inmunológicos.....	21
2.3.3. Métodos moleculares.....	22
2.3.4. Serotipificación.....	25
2.3.5. Subtipificación para estudios epidemiológicos y de población.....	26
2.4. Patogenia de las infecciones por STEC.....	26
2.4.1. Síndrome urémico hemolítico – SUH.....	27
2.4.2. Serotipos STEC asociados a casos de SUH.....	28
2.4.3. Genes de virulencia.....	29
2.4.3.1. Factores de adherencia.....	30
2.4.3.2. Toxina Shiga.....	33
2.4.3.3. Factores adicionales de virulencia.....	36
2.4.4. Resistencia Antimicrobiana (RAM).....	40
2.5. Enfermedades Transmitidas por Alimentos e incidencia de STEC.....	41
2.5.1. Reservorio y transmisión de STEC a los seres humanos.....	44
3. Justificación y Objetivos	48
3.1. Objetivo general.....	50
3.2. Objetivos específicos.....	50
4. Metodología	51
4.1. Obtención de muestras.....	52
4.1.1. Recolección de datos sobre las variables de interés.....	53
4.2. Procesamiento de las muestras en el laboratorio de Microbiología.....	53
4.2.1. Enriquecimiento.....	53
4.2.2. Tamizaje para genes <i>stx</i> y <i>eae</i>	54

4.2.3. Aislamiento de STEC a partir de muestras positivas para <i>stx</i> y <i>eae</i>	55
4.2.4. Detección y aislamiento de <i>Escherichia coli</i> O157:H7	59
4.3. Análisis estadístico	62
4.4. Selección de aislamientos STEC para su caracterización.....	63
4.5. Caracterización fenotípica	63
4.5.1. Resistencia antimicrobiana por el procedimiento de Disco difusión en agar (método de Kirby-Bauer).....	63
4.5.2. Caracterización fenotípica con MicroScan	66
4.5.3. Serotipificación por aglutinación	71
4.6. Caracterización genómica.....	72
4.6.1. Secuenciación genómica completa.....	72
4.6.2. Trabajo manual con las secuencias.....	72
4.6.2.1. Ensamblado de contigs	72
4.6.2.2. Búsqueda de genes de virulencia, resistencia antimicrobiana, serotipificación molecular y determinación del secuenciotipo (MLST y cgMLST).....	74
4.6.2.3. Identificación de profagos y plásmidos	77
4.6.2.4. Filogrupos con ClermontTyping.....	78
4.6.3. Análisis del pangenoma.....	78
4.6.4. Uso de Aries.....	79
4.6.4.1. Asociación filogenética por cgMLST	81
4.6.5. Categorización de las cepas STEC seleccionadas de acuerdo al riesgo para la salud según los niveles de FAO/WHO.....	81
5. Resultados.....	81
5.1. Distribución de las muestras de medias canales analizadas en función de las variables en estudio	83
5.2. Presencia de genes <i>stx</i> y <i>eae</i> en los caldos de enriquecimiento	85
5.3. Asociación de factores con la presencia de genes <i>stx</i> en caldo	85
5.3.1. Categoría animal	86
5.3.2. Establecimiento de faena.....	86
5.3.3. Tipo de faena.....	86
5.3.4. Tipo de alimentación animal	87
5.3.5. Estacionalidad	87

5.3.6. Aplicación de intervenciones antimicrobianas (<i>steam vaccum</i> y/o ácidos orgánicos)	87
5.3.7. Presencia de pelos en la media canal	87
5.3.8. Análisis multivariado	87
5.4. Aislamiento de STEC	88
5.5. Detección y aislamiento de <i>Escherichia coli</i> O157:H7	89
5.6. Selección de aislamientos STEC para su caracterización	90
5.7. Caracterización fenotípica	91
5.7.1. Resistencia antimicrobiana por la técnica de Disco difusión	91
5.7.2. Caracterización fenotípica con MicroScan	93
5.7.2.1. Identificación bioquímica	93
5.7.2.2. Resistencia antimicrobiana según resultados de MicroScan	96
5.7.3. Serotipificación por aglutinación clásica	98
5.8. Caracterización genómica	98
5.8.1. Ensamblado de contigs	100
5.8.2. Búsqueda de genes de virulencia, resistencia antimicrobiana y serotipificación molecular	101
5.8.2.1. Uso del Center for Genomic Epidemiology - CGE y Clermont Typer	101
5.8.2.2. Determinación de subtipos de <i>stx</i> y búsqueda de otros genes vinculados a virulencia por PCR in silico	104
5.8.3. Identificación de profagos y plásmidos	106
5.8.4. Uso de Aries	109
5.8.4.1. Asociación filogenética por cgMLST	112
5.8.5. Análisis del pangenoma	113
5.9. Categorización riesgo FAO/WHO	115
6. Discusión	117
6.1. Prevalencia genes <i>stx</i> y recuperación de STEC	117
6.2. Asociación de variables estudiadas y la frecuencia de genes <i>stx</i> en caldo de enriquecimiento	119
6.3. Prevalencia <i>Escherichia coli</i> O157:H7	121
6.4. Identificación bioquímica por MicroScan	121
6.5. Distribución de serotipos en las cepas STEC confirmadas por WGS	122
6.6. Resistencia antimicrobiana	125

6.7.	Factores de virulencia	127
6.7.1.	Subtipos de <i>stx</i> y <i>eae</i>	127
6.7.2.	Factores de virulencia adicionales	129
6.7.3.	Secuenciotipos y filogrupos	132
6.7.4.	Identificación de profagos y plásmidos.....	135
6.7.5.	Estudio del pangenoma.....	135
6.7.6.	Asociación filogenética.....	136
6.7.7.	Categorización de riesgo FAO/WHO	137
7.	Conclusiones y Perspectivas	139
8.	Referencias	142
9.	ANEXO I – ANÁLISIS ESTADÍSTICO	161

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Visión general de la adquisición y pérdida de genes en diferentes patotipos de <i>E. coli</i> [3].	17
Figura 2. Morfologías de <i>Escherichia coli</i> O121 en el medio mRBA [11].	20
Figura 3. Diagrama de flujo de la técnica MLG 5C “Laboratory Isolation and Identification of Shiga Toxin-Producing <i>Escherichia coli</i> (STEC)” de la USDA (Adaptado de [10]).	23
Figura 4. Diagrama de flujo de la técnica ISO/TS 13136:2012 “Microbiology of food and animal feed — Real-time polymerase chain reaction (PCR)-based method for the detection of food-borne pathogens — Horizontal method for the detection of Shiga toxin-producing <i>Escherichia coli</i> (STEC) and the determination of O157, O111, O26, O103 and O145 serogroups” (Adaptado de [13]).	24
Figura 5. Evolución cronológica de la infección por STEC [18].	27
Figura 6. Organización genética de la isla de patogenicidad LEE. Los genes se colorean de acuerdo a su categoría funcional [26].	30
Figura 7. Rutas potenciales de translocación de Stx a través del epitelio intestinal humano. a) Transcitosis independiente de Gb3 (posiblemente favorecida por la infección de EHEC); b) Transporte paracelular durante la transmigración de neutrófilos (PMN); c) Inducción de la expresión de Gb3 por infección de EHEC, transporte retrógrado y liberación de Stx después de la muerte celular; d) Translocación dependiente de Gb3 por células Paneth; e) Transcitosis por células M [43].	34
Figura 8. Carga de enfermedad (AVAD) de STEC por subregión [82].	42
Figura 9. Descripción general de los posibles reservorios y modos de transmisión de <i>E. coli</i> patógena, incluyendo STEC. Los seres humanos pueden quedar expuestos tras la ingestión de agua o alimentos contaminados o por contacto directo con animales colonizados y la transmisión secundaria puede ocurrir entre humanos, comúnmente en guarderías u hogares de ancianos. Al mismo tiempo, los alimentos pueden contaminarse a través de una mala práctica de cocción o a través de contaminación cruzada con alimentos crudos contaminados. Además, los manipuladores de alimentos sintomáticos o asintomáticos pueden contaminar los alimentos [94].	46
Figura 10. Esponja empleada para la toma de muestra de una media canal hidratada con mTSB.	53
Figura 11. a) Placa de agar MacConkey sembrada a partir de caldo positivo para <i>stx</i> por agotamiento. b) Placa de EMB-Levine sembrada por agotamiento. Se observan las colonias típicas de <i>Escherichia coli</i> con brillo metálico verdoso con centro púrpura oscuro.	54
Figura 12. Gel de electroforesis al 2% bajo luz UV de productos de PCR de detección de <i>stx1</i> , <i>stx2</i> y <i>eae</i> .	56
Figura 13. Placa de MacConkey con 50 colonias seleccionadas de placa con zona de descarga positiva.	57
Figura 14. Placa de CHROMagar O157. Las colonias de <i>Escherichia coli</i> O157 se ven de color violeta-malva.	60
Figura 15. Placa de MacConkey Sorbitol Agar con Cefixime y Telurito. a) <i>Escherichia coli</i> genérica ATCC 25922, b) <i>Escherichia coli</i> O157:H7 sorbitol negativa.	60
Figura 16. Esquema del proceso completo utilizado para el aislamiento de las colonias a caracterizar.	61
Figura 17. Distribución de discos de antimicrobianos en placas de Müller Hinton.	63
Figura 18. Ejemplo de visualización de detección de BLEE.	64

Figura 19. Ilustración de Panel 66 del sistema MicroScan para gram negativos.	66
Figura 20. MicroScan autoSCAN-4 (Beckman Coulter, Inc; USA).	66
Figura 21. Diagrama de flujo de las herramientas utilizadas en ARIES. Fast QC y la tipificación de virulencia se aplica directamente a las lecturas sin procesar, mientras que los análisis MLST se realizan con MentalIST después de recortar. Luego se utilizan los contigs ensamblados en el resto de las herramientas de tipado [20,21].	79
Figura 22. Distribución de la categoría animal de las medias canales en frigoríficos de abasto y exportación.	82
Figura 23. Árbol generado a partir del perfil alélico de cgMLST utilizando chewBBACA y chewTREE de los 50 aislados.	112
Figura 24. Distribución del pangenoma.	113
Figura 25. Árbol filogenético basado en la detección de polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) en genes ortólogos de las 50 cepas analizadas. Se muestran los serogrupos y el gen <i>stx</i> de cada aislado.	114
Figura 26. Distribución de los aislados no-O157 en los niveles de riesgo definidos por FAO/OMS [79].	116
Figura 27. Frecuencias de serotipos de las 39 STEC confirmadas luego de WGS.	124
Figura 28. Subtipos de <i>stx</i> detectados en las cepas STEC estudiadas.	128
Figura 29. Prevalencia de genes de virulencia.	130
Figura 30. Distribución de los ST de las cepas de STEC que circulan en América del Sur, según el análisis de los genomas disponibles públicamente y los datos obtenidos de estudios de vigilancia previos [213].	134
Figura 31. Asociación de serotipos y cgMLST (colores) en árbol construido a partir del perfil alélico de cada aislado.	136

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Patotipos de <i>E. coli</i> 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. Adaptación de [4].	18
Tabla 2. Distribución de serogrupos STEC para casos humanos asociados con SUH, diarrea sanguinolenta u hospitalización en la Unión Europea, 2012–2017 [4].	28
Tabla 3. Principales factores de virulencia descritos para STEC.	37-40
Tabla 4. Secuencias de los cebadores utilizados para la detección de <i>stx1</i> , <i>stx2</i> y <i>eae</i> por PCR a tiempo final [109].	55
Tabla 5. Ciclo de temperaturas utilizado para la detección de <i>stx1</i> , <i>stx2</i> y <i>eae</i> por PCR a tiempo final.	57
Tabla 6. Antibióticos utilizados en la técnica de disco difusión.	63
Tabla 7. Diámetro y puntos de corte de MIC para Enterobacterias. I: Intermedio; R: Resistente; S: Susceptible [4].	64
Tabla 8. Pruebas bioquímicas presentes en el panel Neg Combo Type 66 [112]	67
Tabla 9. Pruebas bioquímicas identificadoras de <i>E. coli</i> [112].	68
Tabla 10. Antibióticos presentes en el panel “Neg Combo Panel Type 66”.	69-70
Tabla 11. Pasos y comandos utilizados para procesar las lecturas de MacroGen con el objetivo de obtener los contigs de las distintas secuencias.	71
Tabla 12. Cebadores de PCR utilizados para la detección de genes de virulencia o adhesión de STEC por PCR in-silico. R: A/G, B: G/T/C, K: G/T, Y: C/T.	73
Tabla 13. Antimicrobianos presentes en la base de datos del ResFinder4.1.	74-75
Tabla 14. Herramientas utilizadas por la plataforma ARIES para la caracterización de <i>E. coli</i> a partir de secuencias crudas.	79
Tabla 15. Combinación de genes de virulencia y estimación del potencial para causar diarrea (D), diarrea sanguinolenta (DS) y síndrome urémico hemolítico (SUH).	80
Tabla 16. Distribución de las muestras analizadas en función de la categoría animal (2018- 2020).	81
Tabla 17. Distribución del muestreo en función de las variables relevadas durante la visita a planta.	82
Tabla 18. Resultados del tamizaje de genes <i>stx</i> y <i>eae</i> en caldos de enriquecimiento por PCR a tiempo real.	83
Tabla 19. Porcentaje de caldos positivos a genes <i>stx</i> 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).	84
Tabla 20. Resultados del análisis multivariado. En color rojo se destacan las variables que mostraron una asociación significativa ($P < 0,05$) con la presencia de genes <i>stx</i> .	86

Tabla 21. Resultados de PCR a tiempo final en la lisis de la descarga en placa de caldos con señal positiva para <i>stx</i> por PCR a real time.	86
Tabla 22. Detalles de las muestras de las que se obtuvieron los aislados a caracterizar	88-89
Tabla 23. Diámetros de zona de inhibición en mm de las 50 cepas frente a los antimicrobianos testeados. En rojo se muestran los valores que evidencian un resultado de resistencia, y en amarillo, resistencia intermedia.	90
Tabla 24. Identificación bioquímica de los aislados mediante sistema semi automatizado MicroScan.	91
Tabla 25. Concordancia con resultados de pruebas bioquímicas esperados para <i>E. coli</i> . En verde si coincide con lo esperado, en rojo si muestra un diferente al reportado por la referencia [112].	93
Tabla 26. Aislados con 5 o más pruebas bioquímicas con resultados no esperados. Referencias: 1. Determinado con SerotypeFinder 2.0; 2. Determinado con MLST Finder 2.0 (<i>E. coli</i> #1); 3. Determinado con Virulence Finder 2.0.	94
Tabla 27. Resultados de CIMs (mg/L) obtenidos a partir del Neg Combo Panel Type 66 del MicroScan.	95
Tabla 28. Resultados de serotipificación por aglutinación con sueros policlonales realizada en la Universidad Autónoma de México.	96
Tabla 29. Marcadores de calidad de FastQC de las lecturas crudas de los 50 aislamientos. En verde se marcan los parámetros para los que se obtuvieron buenos resultados. En los casos que no se especifica lo contrario, se obtuvieron datos equivalentes para R1 y R2 de cada muestra.	98
Tabla 30. Marcadores de calidad obtenidos al correr el programa Velvet para el ensamblaje de los contigs de las secuencias de los 50 aislados. En rojo se señalan aquellas muestras que dieron parámetros de calidad del ensamblado bajos (gran número de contigs de menor longitud).	100
Tabla 31. Resultados obtenidos del Virulence Finder y Serotype Finder para los contigs de los 50 aislamientos analizados. Se marcan como “neg” aquellos genes <i>stx</i> de muestras que habían sido detectados en el PCR a tiempo final realizado al congelar los cultivos y no se confirmaron luego de la WGS.	102
Tabla 32. Secuenciotipos obtenidos a partir del CGE y filogrupos por el Clermont Typer. (*) Resultados asignados por aglutinación; (**) No se puede establecer con certeza. Quizás por una mutación que afecta la unión de uno de los primers; (a) Nuevo alelo en el locus <i>adk</i> , se indica el ST más cercano; (b) Nuevo alelo en el locus <i>gyrB</i> , se indica el ST más cercano; (c) Nuevo alelo en el locus <i>mdh</i> , se indica el ST más cercano; (d) Nuevo alelo en el locus <i>icd</i> , se indica el ST más cercano.	103
Tabla 33. Resultados de la detección de genes asociados con AMR a partir de ResFinder4.1. Entre paréntesis se muestra el número de acceso a la secuencia del gen en el NCBI.	104
Tabla 34. Resultados obtenidos por PCR in silico utilizando IPCress con los cebadores descritos en la tabla 11.	105
Tabla 35. Replicones de profago detectados en las cepas secuenciadas. Las regiones intactas se evidencian en verde, mientras que el celeste y rojo especifican regiones de profago cuestionables e incompletas, respectivamente.	107

Tabla 36. Secuencias plasmídicas detectadas en los aislados de estudio. En verde oscuro se indican aquellos plásmidos con 100% de homología, en verde claro cuando es menor del 100% pero la longitud del fragmento detectado coincide con la longitud del plásmido de referencia, y en gris cuando la identidad es igual al 100% pero la longitud hallada es menor que la plasmídica.	108
Tabla 37. Resultados obtenidos en Aries a partir de las secuencias crudas de las 50 cepas. Se muestran solo los genes de virulencia que tuvieron al menos un resultado positivo para alguno de los aislamientos. Para cada resultado positivo de los genes buscados, se muestra un número que refiere al tipo de alelo para facilitar la comparación entre aislados.	110
Tabla 38. Detección de genes de resistencia antimicrobiana en Aries. N: Número de muestras, ND: No detectados.	111
Tabla 39. Serotipos, niveles de riesgo y subtipos de genes <i>stx</i> de las cepas de STEC aisladas de canales bovinas. En azul se resalta el aislado <i>eae</i> positivo. (a): Solo por serotipificación molecular; (b): No fue posible serotipar por molecular; (c): No coincide con el serotipado por aglutinación que dio O159:H28; (d): No coincide con el serotipado por aglutinación que dio O10:H42.	115
Tabla 40. Cepas <i>stx+</i> que presentan discrepancias entre las metodologías de serotipificación.	123

1. RESUMEN

Escherichia coli productor de toxina Shiga (STEC) es un microorganismo zoonótico que coloniza el tracto intestinal de los animales y causa en el hombre diarrea de severidad variable y enfermedades graves, entre ellas, el síndrome urémico hemolítico post-entérico por STEC (SUH-STEC). El SUH-STEC integra el grupo de las microangiopatías trombóticas que afecta con mayor frecuencia a niños menores de 5 años. Es una enfermedad para la cual no existe tratamiento específico y, en los casos más graves, puede derivar en la muerte del paciente. América Latina tiene una situación endémica de casos de SUH-STEC, y la mayoría de ellos suceden en el sur del continente. En Uruguay se estima que ocurren entre 10 y 15 casos de SUH por año, con una tasa de incidencia de 0,5/100.000 habitantes y de 4-5/100.000 niños menores de 5 años. Hasta el momento no se han reportados brotes de origen común y en ningún caso de los estudiados se pudo establecer el/los alimentos implicados.

El ganado bovino es reconocido como el principal reservorio de STEC, y el consumo de alimentos derivados contaminados, como una de las principales vías de transmisión a humanos. El contacto directo con animales portadores y su entorno, el contacto persona a persona, el consumo de productos lácteos o derivados, y de frutas y vegetales contaminados son otras fuentes importantes de contagio. La presencia de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga (STEC) en alimentos cárnicos representa un riesgo para la salud pública, sobre todos en países como el nuestro, donde el consumo de carne es uno de los más altos del mundo; y al mismo tiempo genera pérdidas económicas en esta cadena productiva por rechazos fundamentados en la presencia de *stx* o STEC en productos cárnicos exportados a mercados exigentes.

Varios factores de virulencia han sido descritos para estas bacterias, pero no se conocen cuáles son las características que definen con certeza a una cepa STEC con capacidad de producir enfermedad grave. El mecanismo de patogenicidad común, que juega un papel esencial en el desarrollo de SUH-STEC, y que define a este patotipo diarrogénico, es la producción de toxina Shiga (Stx). Diversos subtipos de Stx han sido descritos y asociados a distintos riesgos de desarrollar enfermedades, siendo el Stx2a el mayormente asociado a casos de SUH-STEC. La adhesión al epitelio intestinal también ha sido reconocida como un

factor muy importante en la patogenia de estas bacterias, siendo clásicamente vinculada a la presencia y expresión del gen *eae*.

Se han identificado más de 1200 serotipos de STEC y alrededor de 100 han sido asociados a enfermedad en humanos. Si bien se considera al serotipo O157:H7 *stx+*/*eae+* como el más involucrado en brotes a nivel mundial, en la actualidad existen muchos casos de SUH causados por cepas de otros serotipos y con otros perfiles de virulencia (*stx+*/*eae-*). La distribución de estos serotipos es variable y depende de la región o país estudiado.

Esta situación pone de manifiesto la necesidad de avanzar en el análisis y la determinación del potencial virulento de las cepas STEC locales, sobre todo aquellas recuperadas de animales utilizados para el abasto o de alimentos derivados de este origen.

Los objetivos de la tesis fueron aportar al conocimiento local sobre la prevalencia de genes *stx* y STEC en carcasas bovinas listas para entrar en la línea de producción y conocer sus variaciones en función del tipo de animal faenado, tipo de frigorífico, época de la faena, aplicación de intervención y tipo de faena. También se estudiaron las características microbiológicas de un conjunto de cepas presentes en esta etapa de la cadena de producción de carne bovina, generando información sobre los serotipos STEC circulantes en el momento del estudio, su perfil de virulencia, genes de resistencia y así, poder estimar su potencial patogenicidad. En este trabajo se seleccionó para la toma de muestras la última etapa limpia del proceso de la faena para obtener carne bovina para consumo humano. Para esto, se analizaron 800 muestras de medias canales ubicadas en cámara de maduración y obtenidas en 37 establecimientos de todo del país, y se aislaron cultivos *stx+* para su posterior caracterización.

Las muestras fueron analizadas por PCR real time, y aquellas muestras *stx+* se sembraron en medios sólidos en placa con el objetivo de aislar cepas de *Escherichia coli* positivas para los genes *stx1* y/o *stx2*, para luego ser conservadas y caracterizadas.

La prevalencia de genes *stx* (solos o asociados a *eae*) fue del 22,3% (IC95 19,5%-25,3%, n=179), mientras que la prevalencia de STEC fue del 11,3 % (IC95 9,3%-13,7%, n=90) (tomando como STEC positivas aquellas muestras donde se logró obtener al menos una colonia viable, indol positiva y con genes *stx*). Solo en 2 de las 800 muestras (0,25%, IC 95 0%-0,6%) se logró recuperar *Escherichia coli* O157:H7, ambas muestras pertenecientes al mismo establecimiento, en la misma fecha de muestreo y provenientes de medias canales distintas.

A la hora de analizar los resultados de prevalencia de *stx* en función de las variables de muestreo, se realizaron pruebas de Chi², test exacto de Fisher y regresión logística. 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.

Para caracterizar las cepas de STEC se utilizaron procedimientos microbiológicos clásicos, secuenciación completa del genoma (“Whole Genome Sequencing” - WGS) y criterios de riesgo de la FAO/OMS.

Teniendo en cuenta los costos de la WGS se seleccionaron 50 de las STEC dentro de las 121 muestras con aislamientos recuperados para la caracterización. La selección se realizó de modo aleatorio contemplando cubrir todos los establecimientos positivos en los que se recuperaron cultivos STEC de modo que el muestreo fuese representativo.

De las 50 cepas seleccionadas inicialmente, 39 correspondientes a 20 establecimientos fueron confirmadas como STEC por WGS. En este conjunto no detectamos cepas híbridas. Pertenecían a 20 grupos O diferentes y 13 tipos H diferentes. Solo se caracterizó una cepa O157:H7 y, dentro de las no-O157, prevalecieron los serotipos O130:H11 (n = 6), O174:H21/28 (n = 5) y O22:H8 (n = 5). Una cepa mostró resistencia *in vitro* a la tetraciclina y se detectaron genes de resistencia para doxiciclina, sulfonamida, estreptomina y fosfomicina. Treinta y tres cepas (84,6%) portaban los genes para los subtipos *stx2a*, *stx2c* o *stx2d*. El gen *eae* se detectó solo en dos cepas STEC correspondientes a los serotipos O157:H7 (serotipo asociado a casos locales, regionales y mundiales de SUH-STECS) y O182:H25 (ST300). Los genes de virulencia más frecuentes encontrados fueron *lpfA* (n = 38), *ompA* (n = 39), *ompT* (n = 39), *iss* (n = 38) y *terC* (n = 39). Dentro del conjunto de STEC analizado, la mayoría (81,5%) pertenecía a los niveles de clasificación de riesgo 4 y 5 (menor riesgo) de la FAO/OMS. Además, se detectaron los serotipos STEC O22:H8, O113:H21, O130:H11 y O174:H21 pertenecientes al nivel de riesgo 2 asociados a diarrea, colitis hemorrágica o SUH. La única cepa O157:H7

analizada pertenecía al Secuenciotipo (ST) 11. Treinta y ocho aislamientos pertenecieron al tipo B1 de Clermont, mientras que el O157:H7 se clasificó como E.

Las STEC analizadas mostraron una alta diversidad genómica y contenían varios determinantes genéticos asociados con la virulencia, lo que subraya el importante papel de WGS para alcanzar una tipificación más completa. También se comparó entre los distintos aislados, las secuencias plasmídicas y de profagos presentes en el genoma. Al mismo tiempo, se identificaron los genes comunes a todos los aislados y los únicos en algunas cepas, determinando así el pangenoma del conjunto de cepas estudiadas. El análisis filogenético mediante WGS permitió determinar la relación entre los aislamientos, observándose agrupamientos en los árboles filogenéticos realizados (cgMLST y SNP) en función del serotipo y secuenciotipo.

En este trabajo, no detectamos STEC no-O157 de los serogrupos (O26, O111, O145) previamente aislados de casos locales de SUH. Sin embargo, al interpretar estos hallazgos, se debe tener en cuenta el bajo número de aislamientos analizados y limitaciones metodológicas, así como algún sesgo en la selección de colonias realizada para conservar y estudiar. Los datos obtenidos sugieren que el ganado bovino constituye un reservorio local de serotipos STEC no-O157, incluyendo algunos asociados con enfermedades graves en seres humanos. Se necesitan otros estudios que incluyan más etapas de la cadena cárnica para evaluar de manera global su papel real en la propagación local de STEC.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Características generales de *Escherichia coli*

Escherichia coli es un bacilo Gram-negativo, anaerobio facultativo, no esporulado, que forma parte de la microbiota gastrointestinal normal de los seres humanos y diferentes animales. Pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, el grupo más grande y heterogéneo de bacilos Gram negativos de importancia clínica y ampliamente distribuidos en la naturaleza. Se encuentran de forma universal en el suelo, agua y vegetación de todo el planeta [1]. Fue aislada por primera vez en el año 1885 a partir de heces infantiles 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) señalando su presencia en el intestino de individuos sanos [2]. Años más tarde fue nombrada de manera definitiva como *Escherichia coli* en honor a su descubridor [3]. Aunque la mayoría son inofensivas o incluso beneficiosas, las variantes patogénicas descritas hasta ahora pueden causar infecciones entéricas o extra intestinales en seres humanos. En 1894, Escherich informó de la presencia de *B. (E). coli* en la orina de niños con infección urinaria y más tarde aparecen comunicaciones vinculando a esta especie con casos de diarrea infantil [2].

Se piensa que las *E. coli* patogénicas son capaces de surgir continuamente a partir de un ancestro común mediante la pérdida o ganancia de genes y/o elementos genéticos móviles como plásmidos, islas de patogenicidad, integrones, bacteriófagos y transposones conteniendo tanto genes de virulencia como de adaptación [3].

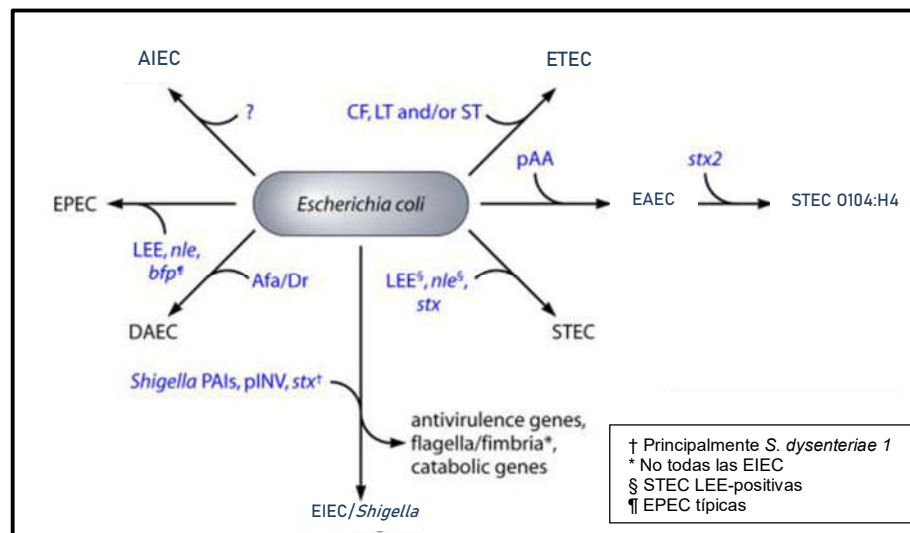


Figura 1. Visión general de la adquisición y pérdida de genes en diferentes patotipos de *E. coli* [3].

Las causantes de afecciones intestinales se denominan DEC (*E. coli* diarreogénicas) y las no entéricas, ExPEC (*E. coli* patógeno extraintestinal). Las ExPEC causan infecciones del tracto urinario (UPEC) y, en menor medida, peritonitis, mastitis, septicemia, meningitis y neumonía. Las DEC se dividen actualmente y de forma esquemática en siete patotipos en función de los rasgos de virulencia, el mecanismo de patogenidad, tipo de manifestaciones clínicas que producen y características epidemiológicas e incluyen *E. coli* productor de toxina Shiga (STEC), *E. coli* enteropatógeno (EPEC), *E. coli* enterotoxigénico (ETEC), *E. coli* enteroinvasivo (EIEC), enteroagregativo (EAEC), *E. coli* difusamente adherente (DAEC) y *E. coli* invasor adherente (AIEC). En la tabla 1 se resumen los principales genes de virulencia y mecanismos de patogenidad de los distintos patotipos [4].

Aunque esta categorización de las cepas de *E. coli* demostró ser muy útil para realizar diagnósticos etiológicos y dirigir los estudios de investigación no es fácil encontrar marcadores virulentos estrictos y permanentes que permitan definir de manera segura los diferentes patotipos, o más aún definir el potencial patogénico de una cepa de *E. coli* en particular. Por el contrario, muchos de esos factores están en elementos móviles, intercambiables y que incluso se pueden perder como se vio más arriba. Esta situación quedó bien establecida en el brote que ocurrió en Europa en 2011 causado por la variante híbrida STEC-EAEC [4]. Además de esta organización genérica y arbitrariamente estricta de los patotipos de *E. coli*, gracias a estudios de WGS, se han descrito cepas híbridas que albergan genes de patogenidad asociados con más de una patovariedad diarreogénica. Estas incluyen

cepas EAEC productoras de toxina Shiga, así como ETEC productoras de toxina Shiga en ganado, cepas EPEC que portan el gen de la toxina termolábil (LT) - *lt*, típico de ETEC, y cepas EPEC que codifican genes que normalmente se encuentran en *E. coli* extraintestinales (ExPEC) [5]. Las cepas híbridas son relativamente raras (si bien los genes de virulencia son móviles no significa que sean estables o exitosos para la supervivencia) pero son ejemplos importantes de las limitaciones de las designaciones de patotipos de DEC.

Agrupar DEC en patotipos en función de las características compartidas es útil para comprender las diferencias en los mecanismos de virulencia, la prevalencia, los modos de transmisión y otras características asociadas con varios subtipos. Sin embargo, el esquema propuesto en la bibliografía no permite describir apropiadamente los perfiles de las cepas que actualmente la genómica ha ampliado por su alta resolución para el diagnóstico [5].

Independientemente del patotipo original, una vez que una cepa de *E. coli* contiene los genes *stx*, puede considerarse una STEC pura o híbrida [4].

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	Stx+	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 Atípica (aEPEC)	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
<i>E. coli</i> Enterotoxigena (ETEC)	Mediado por CF	CFAs, LT, ST	intestino delgado	Presenta genes que codifican toxinas termoestable y o termolábil 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 operon AfaI/dr/daa	Diarrea aguada acuosa en niños. Puede contribuir a la enfermedad de Crohn's en adultos
<i>E. coli</i> adherente invasiva (AIIEC)	NA (invasiva)	Sin caracterizar	intestino delgado	sin caracterizar	Puede contribuir a la enfermedad de Crohn's en adultos

Tabla 1. 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. Adaptación de [4].

2.2. *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 Síndrome urémico hemolítico (SUH). Cuentan con la capacidad de producir potentes citotoxinas capaces de inhibir la síntesis proteica en células eucariotas [6]. La presencia del gen de la toxina Shiga 1 o 2 (*stx1* o *stx2*), típicamente adquirido por bacteriófagos lambdoides, en un aislado de *E. coli* lo define como *E. coli* productor de toxina Shiga (STEC).

El tamaño promedio del genoma de las cepas STEC es de 5.2 MB, llegando a variar un millón de bases entre cepas comensales y variantes patogénicas. Se ha demostrado que del total de 4200-5000 genes que conforman el genoma de este microorganismo, un número menor a 200 se consideran genes conservados (Genoma central o core genome), lo que evidencia que su capacidad patogénica y/o de adaptación a diferentes entornos están vinculada a la flexibilidad de su genoma tanto para incorporar o eliminar material genético en puntos calientes [3]. Los plásmidos son muy diversos y pueden poseer genes para resistencia a antibióticos, virulencia, regulación y adhesinas. A través del proceso de conjugación, éstos pueden transferir fragmentos pequeños o grandes de ADN entre bacterias y transmitir esos rasgos al receptor. Por otro lado, algunos bacteriófagos tienen la capacidad de movilizar genes, como lo demuestra la enorme fracción de partículas de fagos en las heces que contienen ADN bacteriano. A través de la conversión lisogénica los fagos pueden introducir nuevos rasgos fenotípicos, como la resistencia a los antibióticos y la capacidad de producir exotoxina a las bacterias intestinales residentes [7].

2.3. Métodos para detectar, aislar, confirmar y caracterizar STEC en el laboratorio

Escherichia coli en general se caracteriza por ser no formador de esporas, anaerobio facultativo y contar con la presencia de flagelos peritricos en las cepas móviles. Se considera como no exigente nutricionalmente al ser capaz de desarrollarse en medios pobres, es generalmente indol positivo, así como oxidasa, citrato y ureasa negativo. Cuenta con la

capacidad de reducir los nitratos a nitritos y en general fermenta la lactosa [8]. 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 óptima 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 [9].

Es muy difícil distinguir STEC de otras *E. coli* por medio de características fenotípicas, ya que la única característica que identifica específicamente a estas cepas es la producción de toxinas Shiga, que pueden no ser directamente utilizables como marcador fenotípico para identificar STEC en un cultivo mixto. En el mercado existen actualmente medios selectivos y cromogénicos para lograr el aislamiento diferencial de algunos serogrupos, y aunque en algunos casos pueden resultar útiles, ninguno resulta 100% eficiente debido a la gran variabilidad de *E. coli* y la similitud de las morfologías obtenidas [254,255]. De hecho, se ha observado una gran variabilidad de fenotipo incluso dentro del mismo serogrupo O. Un ejemplo de este comportamiento se puede observar en el medio “Modified Rainbow® Agar” (mRBA - Biolog, USA), el recomendado por el Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA) como el método oficial para la detección de las “STEC Top Seven” (O26, O45, O103, O111, O121, O145 y O157:H7) en carnes [10] (Figura 2).

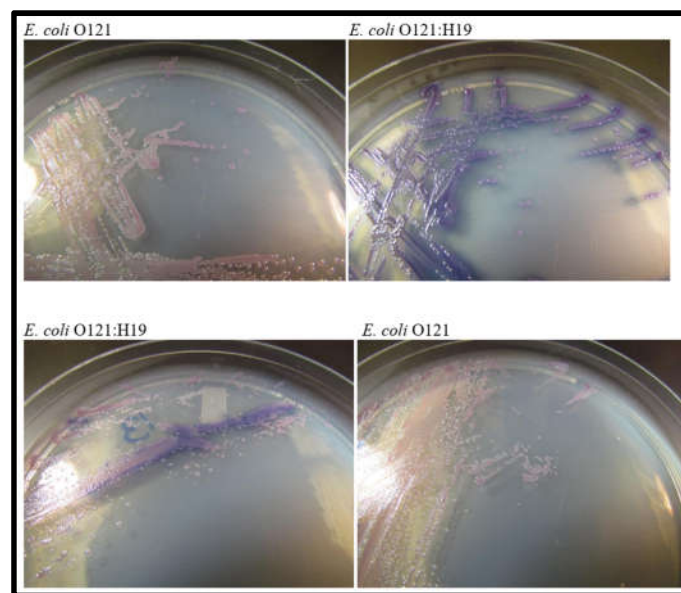


Figura 2. Morfologías de *Escherichia coli* O121 en el medio mRBA [11].

2.3.1. Cultivo celular

Hay dos tipos principales de ensayos basados en cultivos celulares eucariotas: La observación de la actividad citotóxica de las toxinas Shiga en monocapas de células Vero (“Vero Cell Assay” - VCA) y la identificación del patrón de adhesión. El VCA tiene aplicación en el diagnóstico clínico, especialmente porque en algunos casos la identificación de la toxina Shiga libre en muestras fecales es la única forma de confirmar una infección con STEC. Además, a veces es difícil aislar STEC viables de una muestra de heces debido a un muestreo tardío o a la administración de antimicrobianos, mientras que la presencia de Stx permanece a pesar del tratamiento e incluso aumenta con algunos antibióticos. Sin embargo, los costos asociados, el requerimiento de anticuerpos y la habilidad necesaria para llevarlo a cabo han restringido el uso del VCA solo a los laboratorios de referencia [4].

2.3.2. Métodos inmunológicos

Los métodos inmunológicos proporcionan evidencia de la presencia de STEC, basándose en la detección de toxina Shiga libre en muestras de heces o cultivos de otras matrices. Las aplicaciones inmunológicas se tratan principalmente de ensayos tipo ELISA, algunos que pueden llegar también a distinguir entre Stx1 y Stx2 [12].

En cuanto al diagnóstico de STEC, existen algunos inmunoensayos comerciales, pero la mayoría recomienda el cultivo de muestras de heces antes del análisis. Si los cultivos se hicieran antes del análisis, no se conocería la concentración real de Stx en las heces de los pacientes. También existen test rápidos inmunocromatográficos que se utilizan como tamizaje para la selección de niños en los cuales realizar coprocultivo para la búsqueda de STEC. Es importante destacar que no todas las infecciones por STEC están asociadas con diarrea sanguinolenta, por lo que los algoritmos de laboratorio que solo analizan muestras con sangre para detectar STEC ya no se consideran el estándar de atención [12].

De todos modos, el diagnóstico temprano y preciso de las infecciones por STEC después del inicio de la diarrea continúa siendo un desafío para el personal de la salud debido al pequeño

número de casos confirmados por aislamiento bacteriano y/o detección de toxinas. En este sentido, se han utilizado métodos diagnósticos de laboratorio indirectos; como los que detectan anticuerpos contra toxinas Shiga o anti-lipopolisacárido (LPS), útiles en estudios epidemiológicos y búsquedas de casos asintomáticos en brotes [12].

2.3.3. Métodos moleculares

La identificación de los genes que codifican para Stx, es por el momento el enfoque más adecuado y utilizado para la detección y confirmación diagnóstica de STEC, tanto en muestras clínicas, ambientales, de animales y alimentos; ya que la presencia de estos genes es el único factor discriminatorio verdadero entre STEC y otras *E. coli* [4].

Se usan tanto técnicas de PCR a punto final como a tiempo real, utilizando ésta última fluoróforos distintos para identificar diferentes productos de amplificación a la vez, como ser los distintos tipos de *stx* y genes adicionales de virulencia (*eae*, *aggR*, etc.). Dos métodos basados en esta tecnología para la detección de STEC en alimentos han sido adoptados como metodologías estándar en alimentos entre los muchos que se encuentran publicados en la literatura científica, el descrito en la norma ISO 13136:2012 [13] y el detallado en el documento MLG 5C de la USDA [10] (Figuras 3 y 4). Cabe destacar que la detección de uno o más genes *stx* en los alimentos durante las pruebas de rutina, no proporciona evidencia suficiente de que una STEC viable y capaz de causar enfermedad humana, está presente en la matriz. Al mismo tiempo, los fagos Stx pueden estar presentes en los alimentos y pueden arrojar resultados positivos, por lo que generalmente las técnicas culminan con una etapa de confirmación con la recuperación de cepas de STEC viables. Luego de recuperadas, se analiza nuevamente la presencia de genes *stx* y se hacen pruebas bioquímicas y/o por espectrometría de masas (MALDI-TOF) para confirmar que se esté en presencia de una *Escherichia coli* [4].

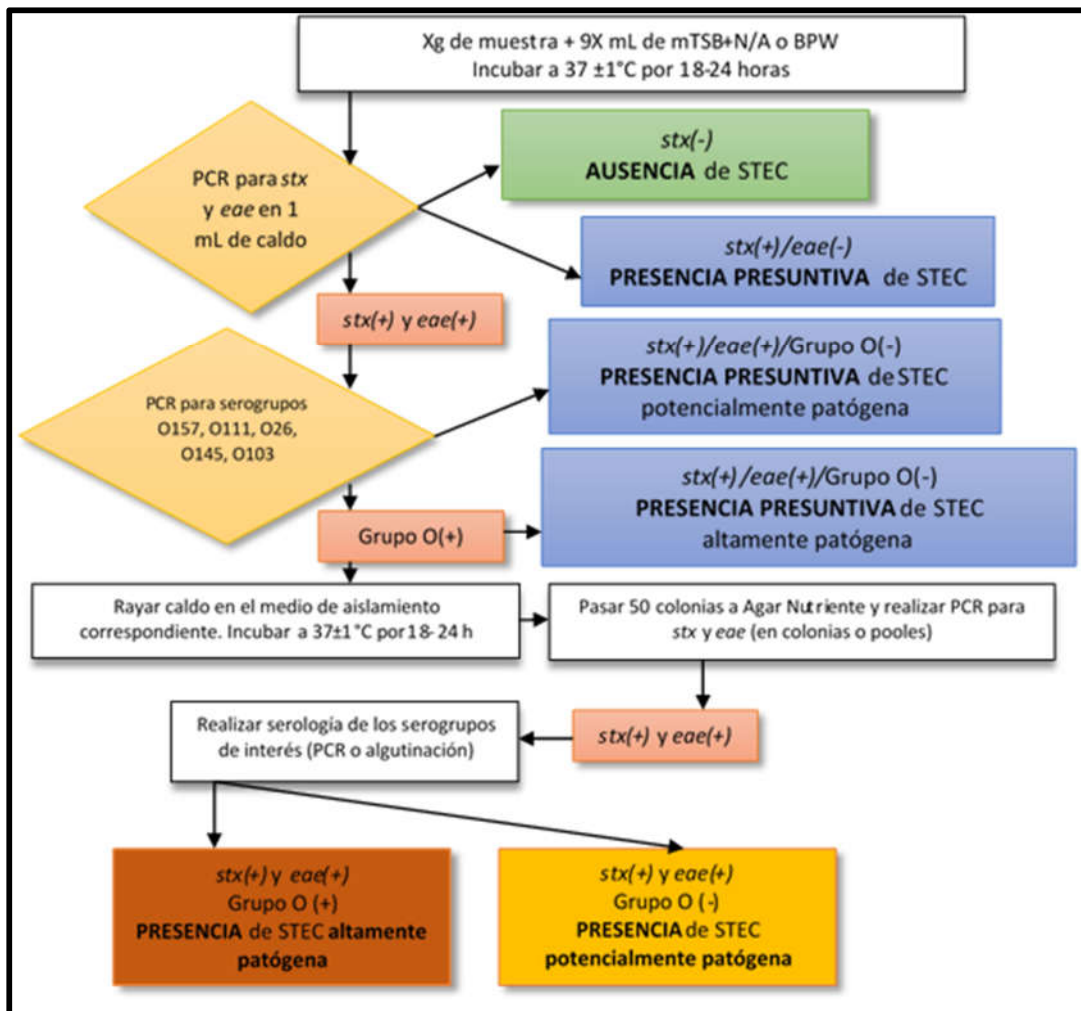


Figura 3. Diagrama de flujo de la técnica MLG 5C “Detection, Isolation and Identification of Top Seven Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STECs) from Meat Products and Carcass and Environmental Sponges” de la USDA (Adaptado de [10]).

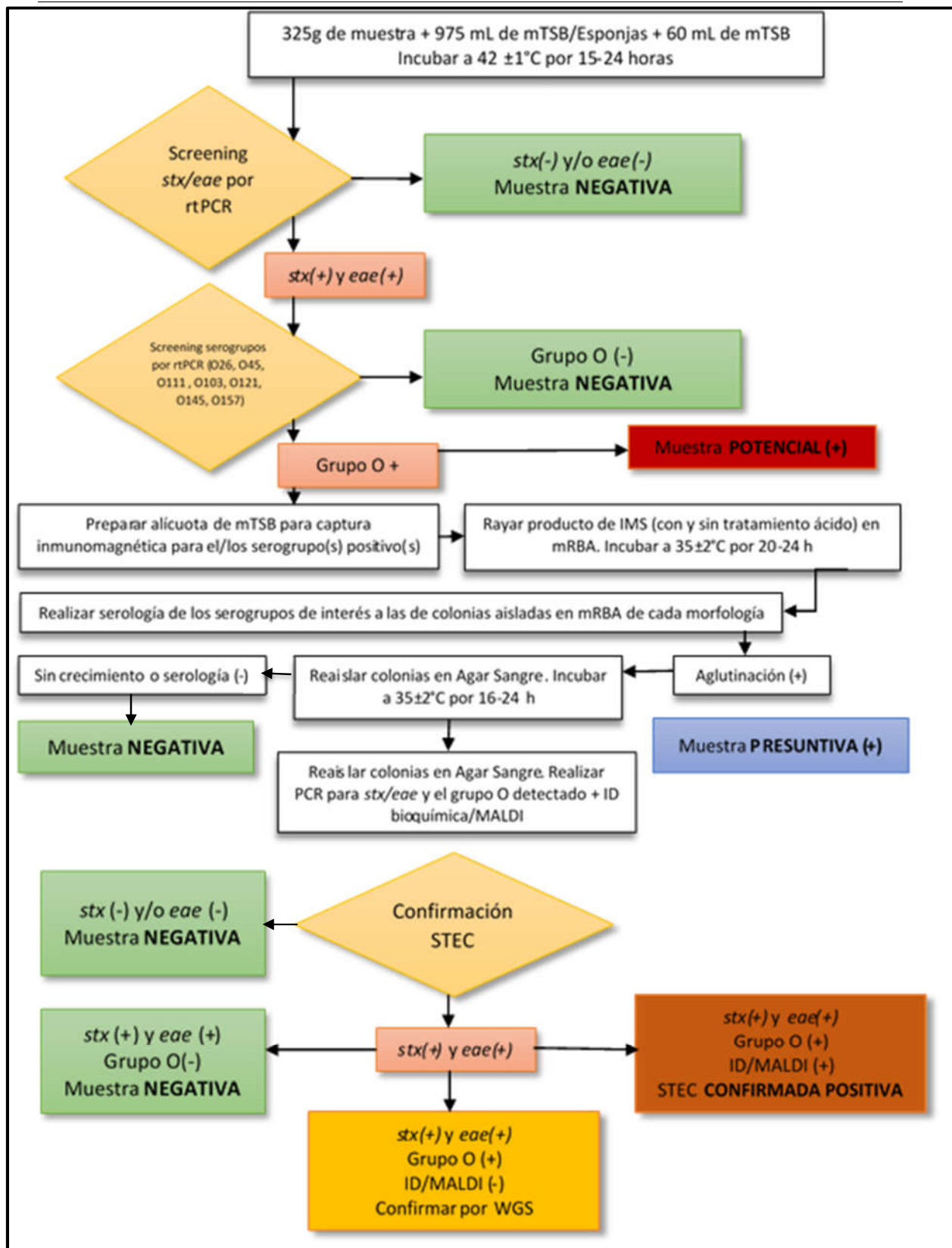


Figura 4. Diagrama de flujo de la técnica ISO/TS 13136:2012 “Microbiology of food and animal feed — Real-time polymerase chain reaction (PCR)-based method for the detection of food-borne pathogens — Horizontal method for the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and the determination of O157, O111, O26, O103 and O145 serogroups” (Adaptado de [13]).

2.3.4. Serotipificación

Identificar el serotipo (combinación O:H) de la/las cepas STEC causantes de una determinada infección ha sido importante en el seguimiento epidemiológico, medición de la incidencia, el seguimiento de la aparición global y la detección e investigación de brotes. Sin embargo, la tipificación serológica de *E. coli* es compleja debido a la gran cantidad de antígenos de tipo “O” somático y “H” flagelar que existen. Además, la mayoría de los factores de virulencia de STEC se encuentran en elementos genéticos móviles que pueden perderse o transferirse y no es raro encontrar cepas STEC del mismo serotipo con diferente perfil de virulencia y potencial patogénico. Como resultado, aunque los datos de serotipos pueden ser útiles para identificar STEC, se requieren datos adicionales para predecir el riesgo para la salud humana [4].

Al mismo tiempo, establecer, mantener y desarrollar el esquema de serotipado (que comprende más de 188 y 53 antisueros O y H, respectivamente) es costoso, laborioso y requiere experiencia y recursos especializados. En consecuencia, la serotipificación fenotípica con sueros es proporcionada por un número limitado de laboratorios de referencia en todo el mundo.

En los últimos años, ha habido un movimiento hacia el uso de métodos moleculares y varias PCR en tiempo real se han desarrollado para la detección rápida de los grupos O de STEC más comunes [14]. Por otro lado, el “Centro de Epidemiología Genómica - CGE” ha desarrollado una herramienta web, Serotype Finder, para predecir el serotipo de *E. coli* a partir del genoma de las cepas. Se encuentra disponible gratuitamente y la base de datos se construyó utilizando genes completos de antígenos O y H de la colección de nucleótidos del “National Center for Biotechnology Information” – NCBI [134]. Todos los genes de la base de datos son comparados con el genoma de cada cepa en estudio, dando como resultado el serotipo O y H en base a la mayor homología [134].

Si bien aún no es considerada la metodología de referencia e implica una inversión en capacitación e insumos, adoptar el enfoque de serotipado *in silico* para tipificar *E. coli* tiene muchas ventajas y una vez implementado, la secuenciación del genoma completo (WGS) puede ser más rápido y rentable que los métodos tradicionales. El serotipado WGS *in silico* evita la necesidad del proceso de producción de antisueros que requiere muchos recursos

(incluyendo trabajo con animales de laboratorio) y los problemas de control de calidad inherentes.

2.3.5. Subtipificación para estudios epidemiológicos y de población

En gran parte de los países se ha comenzado a implementar la secuenciación del genoma completo (WGS, por sus siglas en inglés) para la vigilancia de enfermedades transmitidas por alimentos causadas por STEC y otros agentes, en sustitución de la electroforesis de campo pulsado (PFGE) [4]. La WGS es un enfoque robusto y reproducible, proporciona un nivel sin precedentes de poder discriminatorio, prestándose a comparaciones de cepas entre laboratorios, incluso para investigaciones de brotes, y puede ser rápido y fácil de usar [15]. Además, genera otros datos que permiten analizar en detalle las cepas en estudio como en nuestro trabajo (genes de virulencia y variantes, resistencia, secuenciotipo por MLST, filogrupos, filogenia SNP, etc.)

Hay una variedad de métodos disponibles para evaluar la relación entre aislados, incluido el análisis de la diferencia en los polimorfismos de nucleótido único (SNP), la presencia o ausencia de genes en todo el genoma, las diferencias de alelos genéticos, etc. Los brotes transmitidos por alimentos pueden ser nacionales o internacionales y es de vital importancia que los datos de la tipificación con WGS puedan intercambiarse a través de las fronteras [16]. Para *E. coli*, la tipificación de SNP y MLST de genoma completo (cgMLST/wgMLST) son actualmente los métodos más comúnmente aplicados para el análisis de comparación filogenética.

2.4. Patogenia de las infecciones por STEC

Las infecciones producidas por STEC pueden ser de distinta gravedad, desde portadores asintomáticos sin ninguna sintomatología, hasta enfermedades severas como SUH que pueden ocasionar la muerte del paciente. Las presentaciones clínicas son poco específicas y difieren mucho con la edad del paciente, lo que conduce a un sub-diagnóstico y también a

cometer errores en los tratamientos médicos indicados. Particularmente en niños menores de cinco años pueden producir infecciones leves, asintomáticas, diarrea acuosa y diarrea con sangre (DS) o procesos más severos como colitis hemorrágica (CH) o SUH [4,6].

2.4.1. Síndrome urémico hemolítico – SUH

El Síndrome Urémico Hemolítico es una enfermedad de comienzo agudo definido clásicamente por la presencia de anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia, y compromiso renal que se presenta generalmente a continuación de un episodio de diarrea con o sin sangre (SUH-postentérico). Estos síntomas pueden acompañarse con fiebre, vómitos, dolor abdominal, y anuria u oliguria. Además, puede afectar otros órganos como sistema nervioso central, pulmones, páncreas y corazón, y llevar a la muerte debido a complicaciones neurológicas, intestinales, cardíacas o a infecciones intercurrentes. El período de incubación puede variar entre 2 y 10 días, con una media de tres o cuatro. En niños podría extenderse hasta tres semanas o más después del comienzo de la diarrea, y una semana en los adultos [17]. Una representación de la evolución cronológica de la infección por STEC más común en niños pequeños se presenta en la Figura 5 [18, 41]. En Argentina, el SUH es la principal causa de insuficiencia renal aguda, la segunda de insuficiencia renal crónica en pacientes en edad pediátrica y el responsable de aproximadamente el 20 % de los trasplantes de riñón en niños [19]. El agente etiológico más comúnmente asociado a SUH es *Escherichia coli* productor de toxina Shiga (STEC) [17].

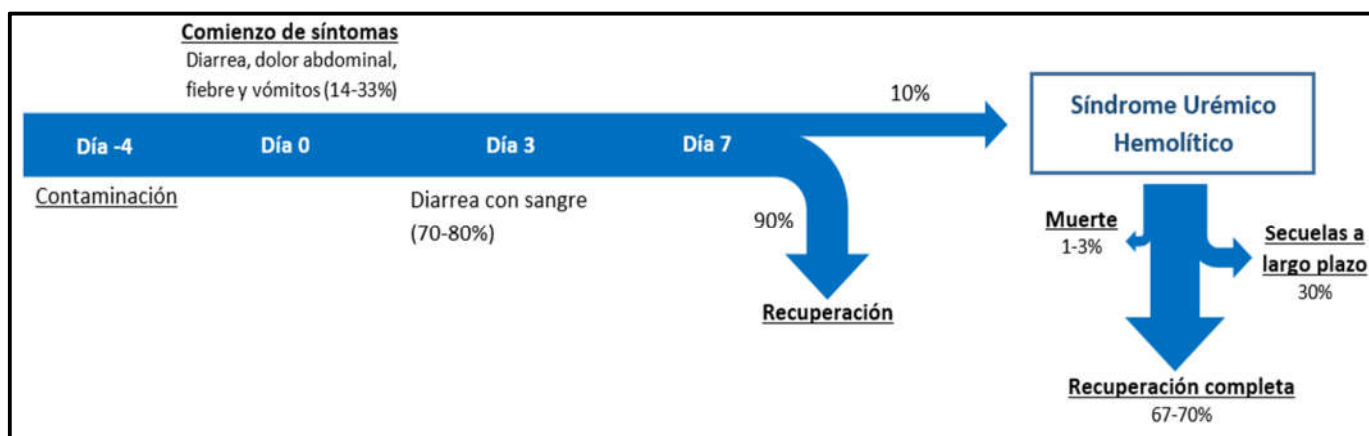


Figura 5. Evolución cronológica de la infección por STEC [18,41].

2.4.2. Serotipos STEC asociados a casos de SUH

Desde la descripción de *Escherichia coli* O157:H7 como un importante patógeno transmitido por los alimentos, los datos de serotipos se han utilizado como un factor para identificar las cepas de STEC que tienen el potencial de causar enfermedades humanas graves. En la UE, los cinco serogrupos principales asociados a casos de SUH en el 2021 fueron O26 (34%), O157 (19.6%), O80 (11%) y O145 (7.6%) [20]. En el periodo del 2012-2017 los serogrupos más frecuentemente asociados con las infecciones graves por STEC (SUH, hospitalización o diarrea sanguinolenta) fueron O157 y O26. Los serogrupos O111, O80 y O145 estaban entre los cinco serogrupos más comúnmente informados en casos de SUH, los serogrupos O145, O103 y O111 en los casos hospitalizados, y los serogrupos O103, O145 y O91 en los casos de diarrea con sangre. En el total de ese periodo, se informaron 49, 88 y 95 serogrupos O diferentes en casos de SUH, hospitalizados y diarrea sanguinolenta, respectivamente (Tabla 2) [4].

Tabla 2. Distribución de serogrupos STEC para casos humanos asociados con SUH (HUS), diarrea sanguinolenta (BD) u hospitalización en la Unión Europea, 2012–2017 [4].

Serogroup	Number of HUS cases	%	Serogroup	Number of hospitalised cases	%	Serogroup	Number of BD cases	%
157	634	38.4	157	2,753	60.4	157	4,245	71.6
26	403	24.4	26	705	15.5	26	582	9.8
111	85	5.1	145	137	3.0	103	162	2.7
80	74	4.5	103	107	2.4	145	159	2.7
145	68	4.1	111	97	2.1	91	64	1.1
55	48	2.9	146	51	1.1	146	51	0.9
121	44	2.7	91	33	0.7	111	49	0.8
103	42	2.5	55	32	0.7	128	32	0.5
91	17	1.0	5	26	0.6	5	28	0.5
104	6	0.4	174	21	0.5	55	27	0.5
Other	232	14.0	Other	598	13.1	Other	532	9.0
Total	1,653	100.0	Total	4,560	100.0	Total	5,931	100.0

Por otro lado, en Estados Unidos, los 10 principales serogrupos STEC asociados con enfermedades humanas son O157, O26, O103, O111, O121, O145, O45, O118, O186 y O71 [21]. En Uruguay, en los casos de SUH con recuperación de cepas STEC, predominan los serogrupos O26, O111 y O145 [22]. En Argentina durante el año 2020, O157:H7 representó el

58,75% de los casos de SUH con cultivo positivo y las STEC no O157 el 41,25%, siendo los serogrupos más frecuentes O145, O121, O26 y O103 [17].

Si bien en los controles bromatológicos de alimentos, y por exigencias internacionales para el comercio, se sigue realizando la búsqueda de serogrupos específicos, el serotipo en sí mismo no es un factor de virulencia y mucho menos puede tomarse como único indicador de riesgo para el desarrollo de patologías severas. Muchos genes de virulencia de STEC son móviles, localizados en plásmidos, fagos, transposones o islas de patogenicidad, y pueden perderse o transferirse a cepas STEC de otros serotipos e incluso a bacterias de otros géneros, por lo tanto, las cepas de STEC del mismo serotipo pueden no portar los mismos genes de virulencia o presentar el mismo riesgo para la salud. Como resultado, aunque la información de serotipos sigue siendo útil para la vigilancia epidemiológica, por sí solos no son suficientes para evaluar el riesgo que representan para la salud las cepas de STEC [4].

2.4.3. Perfiles de virulencia asociados a patogenicia

La infección por STEC es un proceso complejo que involucra la expresión de varios genes. Comienza con la ingestión de un número suficiente de células bacterianas para causar una infección, que según se describe en la bibliografía, sería una dosis infectiva baja de 10-100 UFC [23]. Una vez ingeridas, las cepas deben pasar por el estómago e intestino delgado, donde la supervivencia depende entre otros de los productos de genes como *ure*, *katP* y *terE*, cuya función está vinculada en superar los efectos letales del pH gástrico, enzimas pancreáticas, especies reactivas del O₂, etc. Luego, al llegar al intestino grueso (sitio primario donde STEC causa las lesiones histopatológicas) se produce la unión inicial, primero por el contacto con los enterocitos a través de adhesinas fimbriales codificadas, por ejemplo, por *hcp*, *ecp* y *efa* que desencadenan la expresión de los genes de la gran isla de patogenicidad llamada “LEE – Locus of Enterocyte Effacement (Locus de borramiento de enterocitos)”. Los genes de LEE *eae*, *tir*, *espA*, *espB*, *espC* y *espD*, entre otros, codifican todas las moléculas necesarias para la formación de lesiones de fijación y borramiento (A/E), incluyendo una variedad de proteínas efectoras que son translocadas al interior de los enterocitos. En las cepas STEC LEE negativas,

existen otros genes como por ejemplo, *saa*, *lpf* y *sab*, que proporcionan mecanismos alternativos para la adhesión a los enterocitos [4]. Una vez adheridas, las células STEC deben multiplicarse y colonizar, lo que requiere la expresión de una variedad de genes involucrados en el metabolismo y funciones relacionadas (*arab*, *nirB*, *gabT*, *glpB*, *trpA*, *ybaT*, *yjeH*, *agaW*, *btuR*, *pdxA*, *azoR*, *fadA*, *yjbB*, *caa*, *mhpR*, *araC*, *ascG*, *yjiR*, *nor*, *ytfE*, *yhil*, *mdtE*, *mdtM*, *yhbU*, *yghU*, *degQ*, etc. [24]). En este punto, las células STEC pueden producir el factor de virulencia principal, la toxina Shiga codificada por los genes *stx*. Las Stx atraviesan la barrera mucosa y producen daño endotelial a nivel de la lámina propia del colon y luego de pasar a la circulación general también en la microvasculatura de diferentes parénquimas como la renal y del sistema nervioso central [4].

Se desconoce la combinación mínima de genes requerida para causar una enfermedad grave e incluso si esto fuese así, se debería tener en cuenta también que hay muchos factores que también influyen, como ser, los niveles de expresión génica, la existencia de genes alternativos realizando funciones similares, factores del huésped, etc. [4].

2.4.3.1. Factores de adherencia

El tipo de adhesión a las células del epitelio intestinal variará notablemente dependiendo de los genes de virulencia presentes. Es en función de esto que se distinguen dos patrones de adherencia a las células intestinales (LEE+ y LEE-), dependiendo de la presencia o ausencia del gen *eae*, que codifica la proteína de membrana externa llamada intimina y que da lugar tanto a la adhesión al enterocito como la lesión A/E característica [25].

Esta lesión está gobernada por la isla LEE, cuyos productos son un sistema de secreción tipo III, la intimina, el receptor translocado que se anclará al borde apical de la membrana citoplasmática del enterocito (Tir) permitiendo la adherencia íntima con la bacteria, y otras proteínas efectoras secretadas (Figura 6). El sistema de secreción es una “jeringa molecular” por la cual las proteínas efectoras se transfieren directamente al citoplasma de la célula huésped modificando ciertas estructuras y funciones [23]. Esta adhesión producirá la formación de una estructura típica denominada pedestal, que conlleva cambios a nivel del citoesqueleto, y la pérdida de las vellosidades intestinales generando que los enterocitos pierdan capacidad de absorción de solutos en el lumen intestinal y se instale una diarrea del tipo acuosa [25].

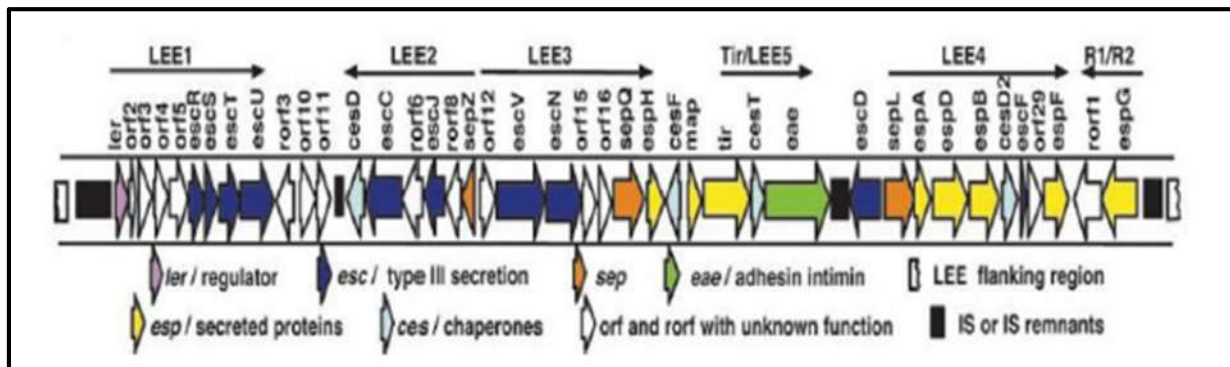


Figura 6. Organización genética de la isla de patogenicidad LEE. Los genes se colorean de acuerdo a su categoría funcional [26].

En resumen, las etapas de la infección con una STEC LEE positiva son:

1. Conexión del citoplasma de la célula STEC al citosol del enterocito del huésped, utilizando el sistema de secreción de tipo III (TTSS), generando una especie de jeringa molecular a través de la cual, las proteínas pasan de las células bacterianas al citoplasma de la célula huésped;
2. Paso de la proteína Tir (receptor translocado de intimina, producto del gen *tir/espE*) a través del TTSS e inserción en la membrana citoplasmática de la célula huésped;
3. Formación de un puente de intimina entre la bacteria y célula huésped;
4. Inyección de una variedad de proteínas codificadas por *rtx*, *hlyA*, *fepC* y *efa1/lifA* y una variedad de moléculas efectoras en la célula huésped que cumplen múltiples funciones, incluida la hemólisis, la represión de la respuesta de los linfocitos del huésped, inhibición de la fagocitosis, invasión, citotoxicidad y transporte de hierro;
5. Activación de las vías de señalización en la célula huésped que da como resultado la destrucción de microvellosidades y la remodelación del citoesqueleto de la célula huésped en pedestal - A/E [26].

El gen *eae* es altamente polimórfico, con más de 34 variantes genéticas diferentes (alelos) designadas por letras griegas clasificadas en diferentes subtipos según la variedad de la región C-terminal de 280 aminoácidos [27,28]. La región C-terminal altamente divergente de *eae* constituye parte de la molécula que se une a los receptores en la célula epitelial (incluyendo TIR), por lo que los diferentes subtipos pueden conferir distintos patrones de colonización dentro del intestino humano, lo que conduce a una capacidad patogénica distinta y la evasión

de la respuesta inmune local de tipo IgA. Entre los subtipos de *eae* conocidos descritos hasta ahora, se ha informado que cuatro (β , ϵ , $\gamma 1$, ϑ) están asociados con STEC más virulentos [28]. Sin embargo, la prevalencia de las diferentes variantes de intimina es muy variable y hay datos muy limitados sobre la asociación de diferentes tipos de intimina y la gravedad de la enfermedad. Por lo tanto, actualmente no hay datos suficientes para evaluar qué variantes están asociadas con resultados de enfermedades específicas [4].

Cepas STEC LEE-negativas (*eae* negativas) también se han aislado como causantes de DS y SUH [29]. Una cepa STEC O113:H21 *eae* negativa se aisló por primera vez de un niño con SUH en 1983 y este serotipo más tarde causó un grupo de casos de SUH en Australia [30,31]. Se entiende que las cepas STEC LEE-negativas tienen otros medios o mecanismos para la adherencia. Por ejemplo, las cepas O113:H21 aisladas tenían la adhesina aglutinante (Saa) [30,31].

Se han detectado también STEC conteniendo el gen *aggR*, marcador de cepas EAEC, que codifica un regulador transcripcional bacteriano ubicado en el plásmido pAA y controla la expresión de las fimbrias de adherencia agregativa (AAF), dispersina, el translocador de dispersina Aat y el sistema de secreción tipo VI Aai. Como los genes *aggR* residen en plásmidos que se pueden perder después de que se produce la enfermedad, los marcadores cromosómicos como el gen *aaIC* también se han utilizado para identificar cepas EAEC e híbridas STEC-EAEC [32].

Entre otros de los genes que podrían estar actuando como factores de adherencia en STEC se identifica a *sab*, que codifica una proteína autotransportadora de la membrana externa que favorece la formación de biofilms, y *paa*, *efa1*, *ompA*, *ompT*, *lpfA*, que codifican adhesinas [33,34]. El gen *toxB*, que también codifica para una adhesina, fue encontrado en varios serotipos tanto LEE positivos como negativos [35]. El papel de estos factores en el mecanismo de virulencia de las cepas STEC LEE negativas no se ha determinado por completo, por lo que a menudo se consideran factores de virulencia putativos y su prevalencia varía entre las cepas de STEC vinculadas a enfermedad [4].

En 2017, Montero *et al.* describieron una isla de patogenicidad de 86 kb compuesta por cuatro módulos y 80 genes, incluidos factores de virulencia nuevos y conocidos asociados con la adherencia y la autoagregación. La isla ha sido denominada *Locus de Adhesión* y

Autoagregación (LAA), y el análisis filogenético realizado utilizando secuenciación del genoma completo, muestra que LAA está presente exclusivamente en un subconjunto de cepas STEC LEE negativas emergentes, incluso en algunas cepas aisladas de casos de colitis hemorrágica y SUH [36]. También se ha descrito el gen *hes*, localizado en el módulo I de LAA, que codifica para el antígeno Hes (hemaglutinina de *E. coli* productora de toxinas Shiga). Al igual que otros miembros de la familia Hra, Hes es un factor de virulencia que participa en varios fenotipos asociados con la colonización, vinculado con la hemaglutinación, la adhesión y la autoagregación. Estos autores sugieren que la adquisición de esta isla es un evento evolutivo reciente y su identificación será útil en estudios epidemiológicos que evalúen el riesgo para la salud pública de las diferentes cepas STEC [37].

Con base en la información anterior, se puede concluir que mientras la mayoría de STEC asociadas con enfermedad grave son portadoras del gen *eae*, sin embargo, existen mecanismos alternativos de adherencia y hay evidencia de muchos casos de cepas *eae* negativas vinculadas con cuadros graves. Al mismo tiempo, se han descrito cepas STEC *eae* positivas que han causado una enfermedad leve, como ser casos de diarrea autolimitada. Es así, que el gen *eae* no es un marcador definitivo de gravedad de patogenicidad, pero puede, en combinación con otros genes de virulencia, ser considerado un indicador general de que una determinada cepa tiene un alto potencial para causar una enfermedad grave [4].

2.4.3.2. Toxina Shiga

La familia de las toxinas Shiga - Stx, incluye proteínas de estructura A1:B5; tienen una subunidad A, cuyo dominio A1 presenta actividad enzimática, y 5 subunidades B idénticas que interactúan específicamente con un receptor glicolipídico, el Gb3 o Gb4, presente en las células blanco para la internalización de A1. Estos receptores celulares se encuentran en varios órganos, incluyendo los riñones, el hígado, cerebro y páncreas; y se expresan en alta concentración en el tejido endotelial, sistema nervioso central, riñones e intestino de niños menores de 5 años [38]. El dominio A tiene función de ARN N-glicosidasa, que inhibe la síntesis de proteínas al remover una base de adenina del ácido ribonucleico 28S de la subunidad 60S y, en consecuencia, puede inducir la apoptosis [39,40]. Las lesiones renales asociadas a SUH se deben a la apoptosis de las células endoteliales, responsable de la microangiopatía trombótica característica de estos casos [41]. Schüller en 2011 propuso distintas rutas por las

cuales las toxinas pueden translocarse a través del epitelio intestinal que se muestran en la figura 7 [42].

Antigénicamente la familia de Stx se divide en dos tipos principales: Stx1 y Stx2, siendo Stx1 altamente conservada, muy similar a la toxina Shiga producida por cepas de *Shigella dysenteriae* serotipo 1. Los distintos subtipos se han organizado en un sistema taxonómico basado en la variación en la secuencia de aminoácidos, distinguiendo tres subtipos Stx1 (a, c y d) y siete Stx2 (a, b, c, d, e, f y g) [40]. En años posteriores se han propuesto subtipos Stx adicionales: Stx1e, Stx2h, Stx2i, Stx2j, Stx2k, Stx2l, Stx2m y Stx2o. Dado que se puede definir un nuevo subtipo de Stx con una diferencia de tan solo el 2,3% en la identidad de aminoácidos y tomando en cuenta la gran diversidad de cepas STEC y el alto potencial constante de mutación y diversificación de los fagos *stx*, parece probable que existan y sigan apareciendo otros subtipos de Stx [43].

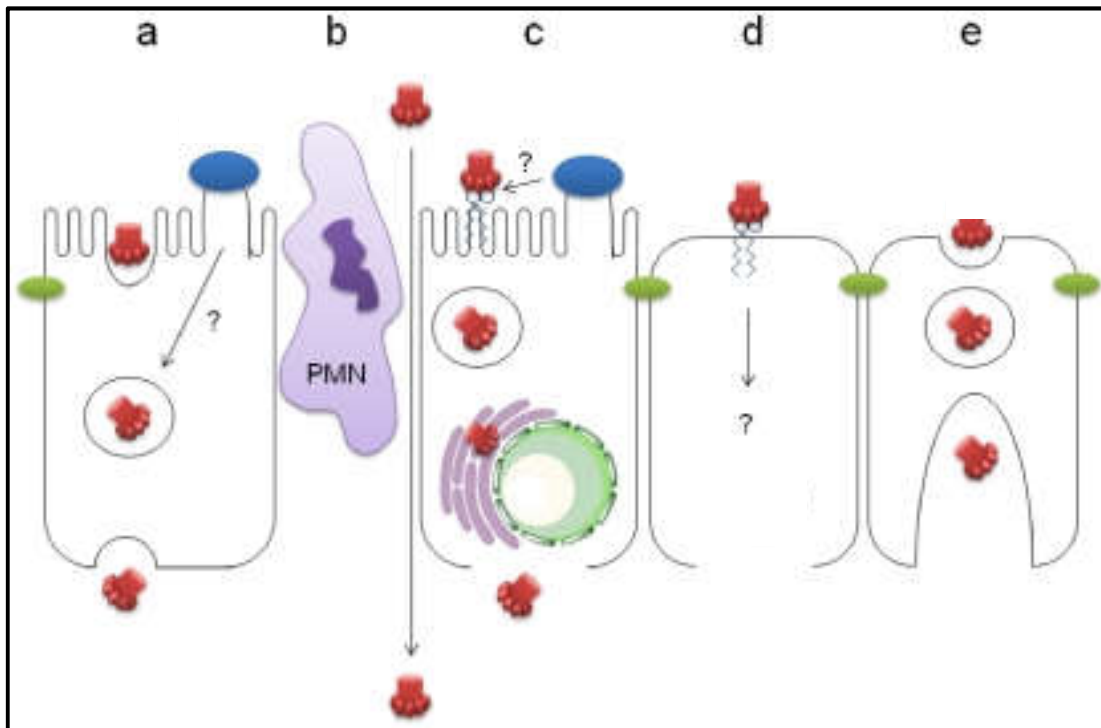


Figura 7. Rutas potenciales de translocación de Stx a través del epitelio intestinal humano. **a)** Transcitosis independiente de Gb3 (posiblemente favorecida por la infección de EHEC); **b)** Transporte paracelular durante la trans migración de neutrófilos (PMN); **c)** Inducción de la expresión de Gb3 por infección de EHEC, transporte

retrógrado y liberación de Stx después de la muerte celular; **d**) Translocación dependiente de Gb3 por células Paneth; **e**) Transcitosis por células M [42].

Las cepas de STEC pueden producir cualquier subtipo de Stx o una combinación de varios, sin embargo, no todos los subtipos han estado implicados en casos de enfermedad grave. Por ejemplo, dentro del grupo de las Stx1, no se tiene ningún dato que vincule al subtipo *stx1d* (frecuentemente encontrado en animales, pero rara vez en humanos) con casos clínicos [4]. Los estudios han demostrado que Stx2 es más importante que Stx1 en el desarrollo de SUH y se ha observado que este grupo tiene un efecto tóxico mayor que Stx1, tanto sobre células del endotelio renal humano *in vitro*, como en modelos animales *in vivo* [44,45]. De todos modos, existe evidencia contradictoria sobre los subtipos *stx2* y su asociación con enfermedad severa. Esto se complica aún más por el hecho de que algunos subtipos de *stx2* comparten altos grados de similitud genética y pueden haber sido mal identificados. El aumento del uso de la secuenciación masiva debería ayudar a aclarar las asociaciones de subtipos de *stx* con casos clínicos [4].

En resumen, a partir de hallazgos epidemiológicos se establecieron las siguientes relaciones con respecto a los subtipos y su relación con enfermedad en humanos [4]:

- Las cepas portadoras del gen *stx1a* están asociadas con hospitalización y diarrea sanguinolenta
- Los subtipos *stx1c* y *stx1d* generalmente se encuentran en aislamientos de STEC *eae*-negativos y se asocian con menos frecuencia a casos clínicos severos en humanos
- El 27-29 % de los casos con cepas portadoras *stx2a*, y el 9-10 % de los casos con cepas *stx2d* se notifican como SUH. Los porcentajes son mayores para hospitalización y diarrea sanguinolenta para *stx2a* (con o sin *eae*)
- Las cepas *stx2b* generalmente se asocian con una enfermedad leve
- Existe incertidumbre con respecto a *stx2c*, ya que se ha informado que está asociado con SUH, pero hay evidencia que sugiere que el subtipo era en realidad *stx2a*
- Los subtipos *stx2e* y *stx2g* rara vez se encuentran en STEC asociadas con enfermedades humanas
- Las cepas portadoras *stx2f* se han aislado recientemente de pacientes con SUH

Los genes *stx* están ubicados en la región tardía de los fagos lambdoides bajo el control de promotores, lo que sugiere que su expresión está asociada con su ciclo lítico. Se ha descrito que se encuentran corriente abajo del promotor tardío pR' y del terminador tardío tR'. Como en el fago lambda, una proteína antiterminadora, llamada Q, tiene un papel importante en la transcripción de estos genes tardíos [46]. Diferentes alelos q han sido descritos, y los más estudiados son los frecuentemente encontrado en las cepas O157: q₉₃₃ y q₂₁ [47]. Otro alelo q menos estudiado es el q₀₁₁₁ que fue encontrado por primera vez en una cepa STEC O111:H- aislada en Japón [48]. Los genes *stx* se expresan a partir de pR' como una proteína tardía, y la actividad antiterminadora de la proteína Q es necesaria para leer el terminador tardío, tR', y la activación de pR'. Aunque los genes *stx* tienen sus propios promotores funcionales, la inducción del profago y la transcripción de pR' es importante para su expresión, así como para la liberación de la toxina desde las bacterias [49].

Por otro lado, si bien no existe acuerdo entre los expertos, se ha descrito que el tratamiento con algunos antibióticos durante la fase diarreica de la infección por STEC, ya que podría aumentar las chances de desarrollar complicaciones severas como SUH al inducir el ciclo lítico y la expresión de Stx [50]. Algunos antibióticos usados en terapia humana o en la alimentación animal como promotores de crecimiento, pueden estimular la inducción de los fagos como por ejemplo la ciprofloxacina o el trimethorprim-sulfametoxazol [51,52].

2.4.3.3. Factores adicionales de virulencia

Como se dijo anteriormente, tanto los factores de adherencia, como los subtipos de la toxina Shiga no son un marcador definitivo de patogenicidad en STEC. Por esto se ha avanzado en la investigación para identificar otros posibles candidatos que puedan ser de relevancia en el desarrollo de la enfermedad en seres humanos. Si bien la literatura científica brinda información importante sobre los genes de virulencia asociados con patogenicidad, no ha sido identificado un marcador definitivo que defina la patogenicidad en términos de la gravedad de la clínica. Un resumen de los principales factores descritos en la tabla 3:

Gen	Producto/Descripción
-----	----------------------

<i>astA</i>	Toxina estructuralmente relacionada con la enterotoxina termoestable (STa) de <i>E. coli</i> enterotoxigénica [53].
<i>cba</i>	Colicina-B formadora de canales. Esta clase de toxinas transmembrana despolariza la membrana citoplasmática, lo que conduce a la disipación de energía celular. Bacteriocinas polipeptídicas producidas y activas contra <i>E. coli</i> y bacterias estrechamente relacionadas [54].
<i>cea</i>	Colicina-E1 formadora de canales. Esta clase de toxinas transmembrana despolariza la membrana citoplasmática, lo que conduce a la disipación de energía celular. Bacteriocinas polipeptídicas producidas y activas contra <i>E. coli</i> y bacterias estrechamente relacionadas [54].
<i>celb</i>	La colicina E2 (ColE2) es una toxina bacteriana proteica producida por algunas cepas de <i>Escherichia coli</i> y otros miembros de <i>Enterobacteriaceae</i> que exhibe actividad inhibitoria contra algunas cepas de <i>E. coli</i> [55].
<i>cdtB</i>	La toxina de distensión citoletal (CDT) induce la detención del ciclo celular G2/M que conduce a la distensión, la inhibición de la proliferación y la muerte de las células endoteliales humanas [56].
<i>chuA</i>	Proteína exterior receptora de membrana implicada en la utilización del grupo hemo [57].
<i>cia</i>	Colicina formadora de canales. Es una clase de toxinas transmembrana que despolariza la membrana citoplasmática, lo que conduce a la disipación de energía celular. Las colicinas son bacteriocinas codificadas por plásmidos, producidas por <i>Escherichia coli</i> en condiciones de estrés, que son citotóxicas para cepas estrechamente relacionadas [54].
<i>cib</i>	Toxina transmembrana que despolariza la membrana citoplasmática, lo que conduce a la disipación de energía celular. Bacteriocinas polipeptídicas producidas y activas contra <i>E. coli</i> y bacterias estrechamente relacionadas [54].
<i>cvaC</i>	Colicina V que mata las células sensibles al interrumpir el potencial de membrana. Las colicinas son toxinas polipeptídicas producidas y activas contra <i>E. coli</i> y bacterias estrechamente relacionadas [54].

<i>ecpA</i>	El “pili común de <i>E. coli</i> ” (ECP) es una adhesina fimbrial, que participa en mecanismos de adherencia y colonización de la célula huésped [58].
<i>ehaA</i>	EhaA se identificó como una proteína autotransportadora (AT) que participa en la adhesión y la formación de biopelículas [58].
<i>ehx/hlyA</i>	Enterohemolisina (<i>hlyA/ehxA</i>) que libera hemoglobina de los glóbulos rojos para proporcionar una fuente de hierro para las células infectantes. El gen <i>ehxA</i> completo tiene aproximadamente 3000 pares de bases y reside en el grupo <i>ehx</i> , que contiene cuatro genes: <i>ehxC</i> , <i>ehxA</i> , <i>ehxB</i> y <i>ehxD</i> . Se ha asociado su presencia en casos de SUH [59].
<i>elfa</i>	Las fimbrias de unión a laminina (ELF) de <i>E. coli</i> median la adherencia a las células epiteliales intestinales humanas [58].
<i>epeA</i>	Proteasas extracelulares de la familia de las SPATE (Serine Protease Autotransporters of <i>Enterobacteriaceae</i>) que funcionan como autotransportadores. Son secretados por el sistema de secreción Tipo Va y son muy diversas en su función, pero se han relacionado con la patogenicidad por su potencial citotóxico [60].
<i>espl/espl</i>	Efactor de tipo III que favorece la adherencia de las células bacterianas [61,62].
<i>espP</i>	EspP (serina proteasa extracelular) que contribuye a la colonización intestinal bovina, vinculada con la formación de biofilms y con potencial citotóxico [60].
<i>etpC</i>	Vía de secreción tipo II [63].
<i>gad</i>	Sistema de glutamato descarboxilasa (GAD) que está presente en <i>E. coli</i> y <i>Shigella</i> . El sistema GAD trabaja para mantener un pH citoplasmático neutral mediante la descarboxilación de glutamato y la exportación de ácido γ -aminobutírico. Este sistema crítico de resistencia a los ácidos también actúa para repeler los protones entrantes a través de la inversión del potencial de membrana [64].
<i>hcpA</i>	Pili tipo IV o pilus hemorrágico que es capaz de mediar varios fenómenos asociados con la patogenicidad, como la adherencia a las células epiteliales humanas y bovinas, la invasión de las células epiteliales, la hemaglutinación de los eritrocitos, la formación de biopelículas, la motilidad espasmódica, la unión específica a laminina y fibronectina y la liberación de citocinas proinflamatorias [65].

<i>hra</i>	Aglutinina resistente al calor que funciona como una proteína de membrana externa que actúa como una adhesina no fimbrial y promueve la aglutinación de eritrocitos humanos y animales y células colónicas humanas [66].
<i>iha</i>	Iha (adhesina homóloga de IrgA), una adhesina similar a <i>Vibrio cholerae</i> IrgA y confiere adherencia [58].
<i>ireA</i>	Se sugirió que IreA estaría involucrada en la adquisición de Fe y actuaría como un gen de virulencia regulado por hierro que ayuda a la adhesión y la resistencia al estrés [67].
<i>iss</i>	Proteína de resistencia al suero que actúa como factor de protección contra la fagocitosis. El gen <i>iss</i> se encuentra en el plásmido ColV, un plásmido de gran virulencia típico de las cepas de <i>E. coli</i> patógenas de aves [68].
<i>katP</i>	Catalasa peroxidasa (KatP) que escinde la pepsina A y el factor de coagulación humano V, lo que contribuye a la hemorragia de la mucosa asociada con colitis hemorrágica en humanos y aumenta la capacidad de colonizar el intestino del huésped en ausencia de oxígeno [69,70].
<i>mch</i>	Codifican para distintas moléculas llamadas microcinas que actúan como inhibitorias bacterianas altamente estables, de bajo peso molecular, producidas en los ribosomas, involucradas en interacciones competitivas y amensalísticas entre <i>Enterobacteriaceae</i> en el intestino. Las microcinas, colicinas, bacteriófagos y algunos antibióticos convencionales comparten varios mecanismos de resistencia cruzada. Se ha descrito que las cepas de <i>Escherichia coli</i> de los filogrupos más invasivos suelen ser microcinogénicas [71].
<i>nle</i>	Proteínas efectoras no codificadas en LEE (Nle A, B, C, D, E y F). Se encuentran codificadas en profagos y son comunes en las cepas STEC. Se cree que cumplen una variedad de funciones, incluida la inhibición de la fagocitosis, la invasión, la citotoxicidad y la adhesión bacteriana [20].
<i>papC</i>	Fimbria que estimula la producción de citoquinas por los linfocitos T actuando como un factor de colonización en infecciones extraintestinales [58].
<i>subA</i>	La citotoxina subtilasa (SubAB) es el prototipo de una nueva familia de toxinas AB5 producida por un subconjunto de cepas STEC e induce características patológicas que

	se superponen a las observadas en el SUH, induciendo daño tisular renal más severo, empeoramiento de la función renal, varias alteraciones eritrocitarias y un aumento de la hemoglobina libre [72].
<i>terC</i>	Gen que codifica para la resistencia al telurito, cuya toxicidad está relacionada con la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) que luego inducen daño a los componentes celulares clave y, en consecuencia, afectan el crecimiento bacteriano. Por lo tanto, la adquisición bacteriana del operón <i>ter</i> puede ser beneficiosa para la colonización del tracto intestinal del huésped en presencia de diversas tensiones y ataques [73].
<i>traT</i>	Codifica para la proteína TraT (proteína de la membrana externa) que confiere capacidad de resistencia del suero y tiene un papel importante en la progresión de las infecciones del tracto urinario [63]. Cabe señalar que la proteína TraT también reduce la susceptibilidad de las bacterias a la fagocitosis por parte de los macrófagos peritoneales [75].
<i>ure</i>	El grupo de genes <i>ure</i> (tres genes estructurales <i>ureA</i> , <i>ureB</i> y <i>ureC</i> y cuatro genes accesorios <i>ureD</i> , <i>ureE</i> , <i>ureF</i> y <i>ureG</i>) está involucrado en el transporte y procesamiento de la urea, en la colonización y, por lo tanto, en la patogenicidad [76].

Tabla 3. Principales factores de virulencia descritos para STEC.

2.4.4. Resistencia Antimicrobiana (RAM)

Si bien el tratamiento con antibióticos de las infecciones por STEC en humanos no está recomendado, ya que existe evidencia de que con algunos puede empeorar la enfermedad al inducir daño tisular relacionado con la toxina y síntomas en los pacientes, se han aislado cepas de STEC resistentes a β -lactámicos, aminoglucósidos, fenicoles y tetraciclinas, entre otros, del ganado de todo el mundo, junto con sus genes e integrones que codifican resistencia [77].

Aunque controvertido, algunos autores recomiendan antibióticos como la gentamicina, la azitromicina, la fosfomicina, los aminoglucósidos y el meropenem para el tratamiento de las infecciones por STEC humanas en su uso temprano (p. ej., etapa BD) para evitar el desarrollo de enfermedades más graves [78].

El monitoreo continuo de la presencia de cepas STEC con resistencia a los antimicrobianos proporciona información sobre la aparición de serotipos resistentes y la dinámica de la transmisión bacteriana para evaluar el impacto potencial en la salud pública y aportar datos actualizados a los programas nacionales e internacionales de vigilancia de la RAM.

Está ampliamente aceptado que el uso extensivo de antimicrobianos en los sistemas de producción animal es un importante impulsor de la resistencia a múltiples fármacos en las bacterias que integran su microbiota. Además, la exposición subterapéutica a largo plazo a los antibióticos puede resultar en la selección de cepas con mutaciones y/o que adquirieron elementos genéticos móviles como plásmidos, transposones e integrones capaces de conferir fenotipos de mayor resistencia a estos compuestos [76]. La presencia de bacterias resistentes a los antibióticos en animales y alimentos, independientemente de su patogenicidad, constituye un riesgo para la salud pública ya que el acervo genético a partir del cual las bacterias patógenas pueden adquirir resistencia a los antibióticos aumenta en el medio ambiente y luego los distintos patógenos con resistencia pueden transferirse de los animales a los humanos a lo largo de la cadena alimentaria, a través de la exposición ocupacional o la escorrentía de estiércol [79].

2.5. Enfermedades Transmitidas por Alimentos e incidencia de STEC

Existen más de 200 enfermedades causadas por consumir alimentos contaminados con bacterias, virus, parásitos o sustancias químicas como metales pesados y otras moléculas nocivas para los seres humanos [80]. Se trata de un creciente problema de salud pública que causa un impacto socioeconómico considerable a través de las tensiones en los sistemas de atención de la salud, la pérdida de productividad por pérdida de jornadas laborales y el daño al turismo y el comercio. Al mismo tiempo, contribuye significativamente a la carga mundial de morbilidad y mortalidad. Las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETAs) ocurren por la contaminación de estos en cualquier etapa de la cadena de producción, entrega, preparación, almacenamiento, distribución y consumo. Pueden ser el resultado de varias formas de contaminación ambiental, incluida la contaminación del agua, el suelo o el aire, así como la posible contaminación cruzada en el almacenamiento y procesamiento de alimentos

inseguros. Estas enfermedades abarcan una amplia gama de afecciones, desde la diarrea hasta el cáncer; presentándose la mayoría como problemas gastrointestinales agudos, aunque también pueden producir síntomas neurológicos, ginecológicos e inmunológicos. Las enfermedades que causan diarrea son un problema importante en todos los países del mundo, aunque la carga la soportan de manera desproporcionada la población de los países de bajos y medianos ingresos y, sobre todo, los niños menores de 5 años de esas regiones, incrementada por la dificultad que tienen para el acceso a los servicios de salud [80].

En todo el mundo, se estima que 600 millones (casi 1 de cada 10 personas) sufren de ETAs cada año, lo que provoca 420.000 muertes y la pérdida de 33 millones de años de vida saludable (AVADs), demostrando que la carga global de ETAs es del mismo orden de magnitud que las principales enfermedades infecciosas como VIH/SIDA, la malaria y la tuberculosis [80]. De los aproximadamente 600 millones de casos estimados por la Organización Mundial de la Salud (WHO) en 2010 causados por 31 peligros alimentarios, los agentes infecciosos que causan enfermedades diarreicas representaron la gran mayoría (550 millones), en particular, *Norovirus* (120 millones de casos) y *Campylobacter* spp. (96 millones de casos). Entre otros peligros, el virus de la hepatitis A, el helminto *Ascaris* spp. y *Salmonella* Typhi fueron también causas frecuentes de ETAs, responsables de 14, 12 y 7.6 millones de casos, respectivamente. Los agentes vinculados a enfermedades diarreicas estuvieron también vinculados a 230.000 de las 420.000 muertes debidas a ETAs. De estas, *S. enterica* no tifoidea representaron 59.000 casos, *E. coli* enteropatógena (EPEC) 37.000, norovirus 35.000, y *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) a 26.000 muertes. Los principales agentes no diarreicos causantes de muertes fueron *Salmonella* Typhi (52.000), el helminto *Taenia solium* (28.000) y virus de la hepatitis A (28.000) y aflatoxina con 20.000 muertes [81].

El impacto global de la infección por STEC se ha estimado en 43,1 casos por cada 100.000 personas, con 3.890 casos anuales de SUH y más de 100 muertes [82]. En números absolutos, se registraron más casos en el Sudeste Asiático seguida de las regiones de Europa y América. La carga más alta cada 100.000 habitantes, sin embargo, ocurrió en la subregión europea con un valor de 0.96-1.2/100k hab., seguido de las subregiones americanas y la subregión del Pacífico Occidental con valores de 0.72-0.96/100k hab (Figura 8) [83].



Figura 8. Carga de enfermedad (AVAD) de STEC por subregión [83].

De modo más localizado, el “Centers for Disease Control and Prevention - (CDC)” de USA informó que la incidencia de infección por STEC fue de 5,9 por cada 100.000 personas durante 2018, un aumento del 26 % con respecto a la incidencia de 2015 a 2017 [84]. Nueva Zelanda comunicó una incidencia media anual de 0,8 por 100.000 personas (2,6/100.000 niños menores de 5 años), Francia 0,49 por 100.000 personas (3,1/100.000 niños menores de 5 años) y China 0,57 por 100.000 personas (0,38/100.000 niños menores de 5 años) [85,86,87]. Por otro lado, América Latina tiene una situación de infección por STEC endémica, con la mayoría de los casos ubicados en el sur del continente. En Uruguay se estima que ocurren entre 10 y 15 casos de SUH por año, con una tasa de incidencia de 0,5/100.000 habitantes y de 4-5/100.000 niños menores de 5 años [19]. En Argentina, donde existe un robusto sistema de vigilancia de este patógeno, la incidencia de SUH durante 2021 fue de 0,6/100.000 personas y 5,95/100.000 niños menores de 5 años, con una letalidad de 1,7% [88]. Se ha estimado que las infecciones por STEC en América del Sur causan aproximadamente el 2 % de los casos de diarrea aguda y el 20-30 % de los casos de diarrea sanguinolenta [89].

El riesgo de que una STEC cause diarrea, diarrea sanguinolenta o SUH, se predice mejor utilizando los factores de virulencia codificados por genes. Sin embargo, todas las STEC, independientemente del subtipo de Stx que produzcan, deben considerarse potencialmente

diarreogénicas, especialmente para individuos susceptibles [78]. Según los conocimientos científicos existentes, se considera que las cepas STEC productoras del subtipo Stx2a y con los genes de adherencia *eae* o *aggR* presentan el mayor riesgo de enfermedad y tienen el mayor potencial para causar SUH. La asociación de STEC que producen otros subtipos de Stx con SUH es menos concluyente y puede variar, dependiendo de muchos otros factores bacterianos y del huésped [78]. Al mismo tiempo, los factores humanos, como el estado general salud, el uso de antibióticos y otros medicamentos, la edad del huésped, la genética y las inmunosusceptibilidades, pueden afectar la gravedad de los resultados de las infecciones por STEC.

Esta caracterización, junto con otros factores como el conocimiento de la naturaleza intrínseca del alimento, la manipulación, la preparación del alimento antes del consumo, y si el alimento se va a proporcionar a consumidores de alto riesgo, podrían utilizarse para determinar el riesgo potencial para la salud humana que plantea una STEC particular que se encuentra en la cadena alimentaria.

2.5.1. Reservorio y transmisión de STEC a los seres humanos

Un análisis de 957 brotes de STEC en 27 países, publicado en 2019 por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) mostró que las fuentes más importantes de STEC para los seres humanos a nivel mundial fueron los productos agrícolas como frutas y verduras (10,8-15,6%), la carne de res (2,6-18,2%) y los productos lácteos (5,5-8,57%), variando su influencia entre las distintas regiones del mundo [90]. Se estimó que la carne de res y las frutas y verduras tenían la mayor proporción de casos de infección por STEC atribuidos en Europa y América. En la Región del Pacífico Occidental, los productos lácteos desempeñan un papel más importante, seguidos de los productos agrícolas y la carne vacuna en tercer lugar. Las posibles explicaciones de la variabilidad regional incluyen diferencias en la proporción de alimentos específicos en la dieta y cómo se preparan para el consumo, el nivel de contaminación por STEC de los alimentos, los animales de los que se derivan, las características de virulencia de las cepas de STEC predominantes regionalmente, o diferencias en cómo se detectan, investigan y notifican los brotes [90]. Sin embargo, más de la mitad de los brotes a nivel mundial (56%) no se pueden atribuir a ninguna fuente, y al mismo tiempo, los alimentos

identificados en las investigaciones de brotes pueden no representar todos los alimentos responsables de enfermedades esporádicas [90].

Los rumiantes, incluido el ganado vacuno, son uno de los reservorios animales de STEC más importantes conocidos actualmente [91]. Estas bacterias colonizan la porción terminal del intestino grueso de bovinos denominada unión recto – anal sin producirles daño y desde allí son excretadas junto con las heces al entorno cercano de estos animales, pudiendo luego ser transportadas más lejos por el agua de lluvia e insectos. Esta excreción se ve influida por múltiples factores, algunos conocidos como categoría animal, época del año, tipo de alimentación y sistema de cría [92,93]. Se ha reportado que la dosis infectante en bovinos es de aproximadamente 300 Unidades Formadoras de Colonias (UFC), y una vez infectado el animal será capaz de excretar altos niveles en las heces. En el caso de *Escherichia coli* O157 se ha evidenciado una excreción de 1.1×10^5 UFC/g de heces durante un periodo aproximado de 10 semanas [94]. También se han descrito animales “supereliminadores”, que excretan grandes cantidades de STEC junto con las heces incrementando así la transmisión y persistencia dentro de un rodeo [90,91].

Cabe destacar que, si bien el ganado vacuno es considerado el principal reservorio de STEC, los ovinos junto con otros pequeños rumiantes como cabras y ciervos, cumplen un rol fundamental con respecto a la diseminación ambiental del microorganismo. Por ejemplo, en Australia los ovinos son considerados el reservorio principal [95]. En mamíferos no rumiantes como caballos, perros y cerdos se ha aislado 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 éstos ya que una vez que no se encuentran expuestos a la fuente de STEC son incapaces de mantener la colonización intestinal [94].

Por otro lado, los humanos cumplen un papel de suma importancia con relación a la propagación de STEC y la aparición de brotes mediante el contacto entre personas, como a través de la contaminación ambiental y alimentaria mediante la diseminación por parte de trabajadores asintomáticos vinculados a la cría de animales de producción o tareas de faena. Estudios realizados en familias que desarrollaban actividades en un tambo en Canadá, determinaron que un 12% de estas personas tenían *Escherichia coli* O157 en las heces sin manifestar síntomas de enfermedad. Otro estudio en trabajadores de mataderos encontró

que el 1.3% eran portadores asintomáticos, eliminando STEC junto con las heces [94] (Figura 9).

Al estar las STEC presentes normalmente en los bovinos a nivel digestivo, cuero y piel, la carne de res puede ser contaminada en diferentes etapas de la cadena de producción, desde el matadero hasta el consumo [4]. En los mataderos, las STEC se pueden transferir a las canales de res durante el sacrificio, el faenado, el enfriamiento o el deshuesado/desosado [97,98]. A modo de ejemplo, uno de los principales indicadores de que existió una contaminación que puede dar lugar a la presencia de STEC, es la presencia de pelos en las canales en las etapas finales de la producción [99,100]. Para controlar la contaminación de las canales de STEC, se ha comprobado la importancia de contar con planes HACCP¹ y buenas prácticas de manufactura que incluyan la aplicación de intervenciones antimicrobianas, como ser la utilización de vapor de agua o ácidos como el láctico y/o el acético, entre otras [98]. Una evaluación de riesgo cuantitativa realizada en mataderos argentinos que aplicaban HACCP publicado en 2020, concluyó que solo el 10% de los casos de SUH estarían vinculados al consumo de carne vacuna. En ese trabajo también se infiere que el alimento de mayor riesgo es la carne picada y que no se esperaría ningún caso por el consumo de otros cortes de carne [98].

Las buenas prácticas agrícolas y posibles intervenciones a nivel de campo son también interesantes estrategias para disminuir la presencia de STEC en el ganado y, por consiguiente, en la carne. Por ejemplo, la vacunación es una de las intervenciones previas al sacrificio que promete reducir la aparición de STEC en el ganado y se ha sugerido como estrategia para prevenir *E. coli* O157:H7 y otros serogrupos [102].

¹ Documento preparado de conformidad con los principios del sistema de HACCP, de tal forma que su cumplimiento asegura el control de los peligros que resultan significativos para la inocuidad de los alimentos en el segmento de la cadena alimentaria considerado [101].

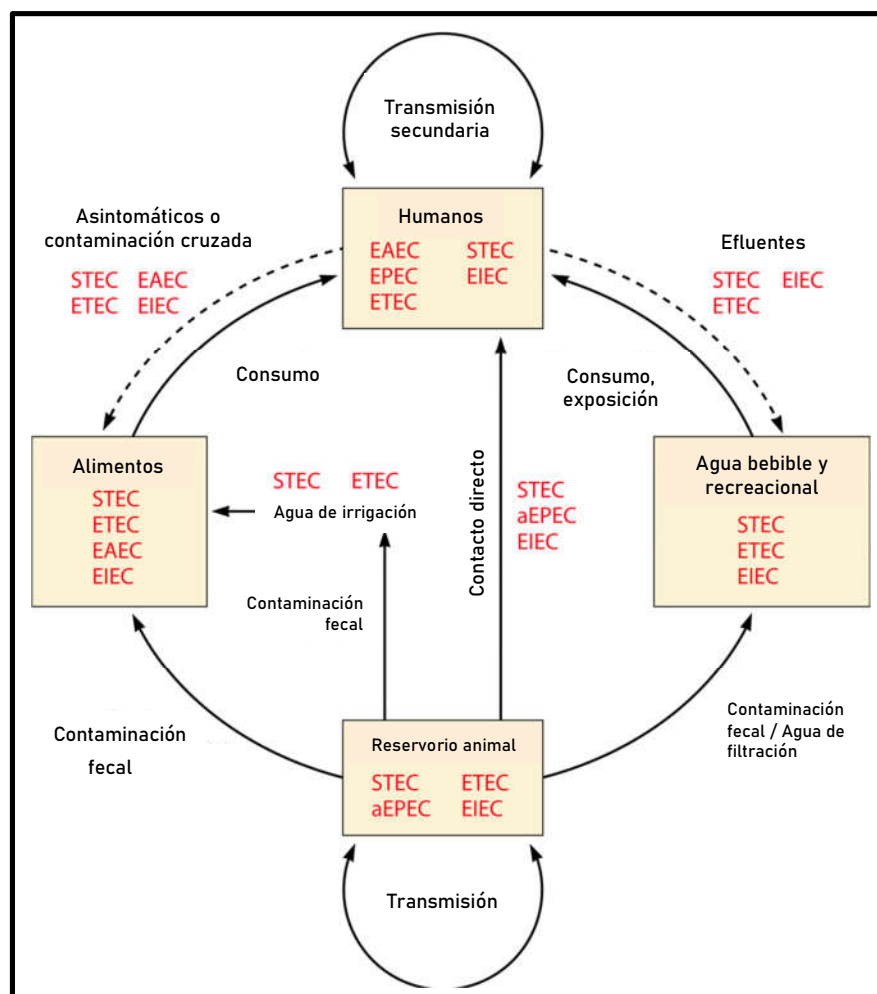


Figura 9. Descripción general de los posibles reservorios y modos de transmisión de *E. coli* patógena, incluyendo STEC. Los seres humanos pueden quedar expuestos tras la ingestión de agua o alimentos contaminados o por contacto directo con animales colonizados y la transmisión secundaria puede ocurrir entre humanos, comúnmente en guarderías u hogares de ancianos. Al mismo tiempo, los alimentos pueden contaminarse a través de una mala práctica de cocción o a través de contaminación cruzada con alimentos crudos contaminados. Además, los manipuladores de alimentos sintomáticos o asintomáticos pueden contaminar los alimentos [96].

En Uruguay, la producción de carne es una de las actividades industriales más relevantes (las exportaciones anuales de carne y derivados superaron en el 2021 los USD 3.000 millones [103]), no solo desde el punto de vista económico, sino también porque constituye uno de los alimentos de mayor consumo en el país. El consumo anual de proteína animal en Uruguay es aproximadamente de 91.2 kg por habitante, de los cuales 46 kg corresponden a carne vacuna representando un 50.4% de la ingesta [104]. El 59.6% del territorio nacional se encuentra dedicado a la actividad ganadera de forma exclusiva, presentando sistemas de cría intensivo de engorde a corral y sistemas extensivos, siendo estos últimos los más implementados [105].

En el año 2021, la División Industria Animal del Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca reconoció a 42 frigoríficos habilitados para realizar la faena de ganado bovino, ovino y suino con destino a consumo interno y / o exportación [106].

Dentro de los principales países compradores de nuestra faena encontramos a China, considerado el principal destino y quien aporta el 60 % del total de ingresos del sector. Luego se ubica USMCA (Estados Unidos, México y Canadá) con el 12% y la Unión Europea con el 11% [103].

Es así como la inocuidad alimentaria juega un papel clave en la comercialización de la carne, tanto a nivel nacional como internacional, y la presencia de microorganismos patógenos como STEC en diferentes cortes cárnicos, representa una de las principales causas de rechazo tanto a nivel del mercado nacional como internacional. A modo de ejemplo, entre el 2020 y el 2022, Uruguay recibió 6 rechazos desde la Unión Europea por la presencia de STEC en carne [107].

3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La presencia de STEC en la carne para consumo humano se considera un peligro y tiene dos impactos negativos claramente definidos, uno sobre la salud humana y otro económico relacionado con la pérdida de mercados compradores de alimentos de esta cadena productiva.

Hoy en día la inocuidad alimentaria juega un rol clave en la prevención de ETAs y en la comercialización de alimentos tanto a nivel nacional como internacional, y 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 afecta la confianza de los compradores. La obtención de información sobre la prevalencia de genes *stx* y STEC en canales bovinas demuestra el interés del país en la generación de conocimiento respecto a la temática, permitiendo también así evaluar la eficiencia de las medidas implementadas por la industria cárnica para controlar y prevenir la diseminación de STEC, e incluso determinar la influencia de algunos factores tanto de los animales como de su manejo en su aparición y frecuencia.

Al mismo tiempo, nuestro país tiene una de las tasas de consumo de carne bovina más altas del mundo, y si bien no se han registrado brotes vinculados a STEC, se estima una incidencia anual de casos de SUH de 5 casos/100000 niños menores a 5 años. Es importante remarcar que en Uruguay el desde el año 2008 los casos de SUH son de denuncia obligatoria. Sin embargo, al no figurar como una entidad claramente definida (se encuentra comprendida en la categoría “Brote o evento de salud pública de importancia nacional”), el equipo de salud no lo reconoce como evento sujeto a notificación obligatoria y por lo tanto no denuncia todos los casos, lo que determina que no haya un registro adecuado de los mismos.

En nuestro país queda por establecer el papel del ganado bovino y de los alimentos derivados como fuente y vehículo de STEC para los seres humanos, evaluar si existe una prevalencia mínima aceptable según un futuro análisis de riesgo, así como definir en qué grado las cepas de STEC presentes tienen la capacidad potencial de causar daño a los humanos. Esta situación pone de manifiesto la necesidad de avanzar en el análisis y la determinación del potencial virulento de las cepas STEC locales como un primer

paso, sobre todo aquellas recuperadas de animales utilizados para producir alimentos de consumo humano.

3.1 Hipótesis de trabajo

I) La prevalencia de STEC en canales bovinas ubicadas en las cámaras de maduración de los establecimientos ganaderos de Uruguay varía en función del tipo de frigorífico analizado, la categoría de los animales y se sitúa en torno al 20%.

II) Las características de las cepas STEC aisladas de canales bovinas en las cámaras de maduración de los establecimientos ganaderos de Uruguay son similares a las de los cultivos STEC recuperados en otros países de la región.

3.2 Objetivo general

El objetivo general de la tesis consiste en aportar al conocimiento local sobre la prevalencia de genes *stx* y describir las características de cepas STEC recuperadas en la última etapa de la zona limpia de la faena durante la producción de carne bovina. Esto permitirá generar información de valor para abordar de forma global el problema de STEC elaborando estrategias de evaluación y comunicación de riesgos, así como sugerir y evaluar medidas aplicadas durante la faena y prefaena para la reducción de estos microorganismos.

3.3 Objetivos específicos

- Determinar la prevalencia de genes *stx* en canales bovinas dispuestas en las cámaras de maduración de frigoríficos locales que exportan y atienden el abasto local.
- Determinar si la prevalencia de genes *stx* se modifica en función de factores tales como: tipo de alimentación de los animales antes de la faena, época del año en la que se realiza la faena, tipo de frigorífico donde se realiza la faena, categoría de los animales sacrificados, tipo de faena, aplicación de intervenciones, etc.

- Determinar cuáles son los serotipos STEC prevalentes presentes en las medias canales en el último paso de la etapa limpia de la faena.
- Conocer la distribución de los genes y marcadores asociados con la virulencia en las cepas STEC recuperadas.
- Establecer el perfil genético, su relación y conocer el ST por MLST de las cepas STEC recuperadas.
- Comparar los resultados obtenidos por diferentes metodologías para la identificación y caracterización de STEC.
- Determinar el perfil de resistencia de un conjunto de cepas STEC para antimicrobianos de uso en medicina humana y veterinaria.

4. METODOLOGÍA

4.1 Obtención de muestras

El diseño de muestreo, tomando como unidad de análisis a la media canal bovina, fue realizado considerando como base que Uruguay disponía, en el año 2017, de 12 millones de cabezas de ganado [105]. En base a trabajos de la región, se tomó como hipótesis que la prevalencia de genes *stx* se encontraría entre un 15-20%, y pretendiendo un intervalo de confianza del 95 % y un error de 3%, se estableció un $n= 800$ [108].

El muestreo fue de tipo estratificado, separando las muestras en dos segmentos exclusivos según si fueron tomadas en frigoríficos de abasto o de 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 por el frigorífico en base a datos provenientes de la División de Industria Animal - MGAP.

Las muestras fueron obtenidas a partir de 37 frigoríficos (13 de abasto local y 24 de exportación), representando el 88 % de los frigoríficos habilitados para la realización de faena bovina en el año 2018. El período de muestreo fue entre agosto del 2018 y julio de 2020, incluyendo así dos estaciones cálidas y dos frías. De este modo, 63 de las 800 muestras (7.9%) provinieron de frigoríficos de abasto y 737 (92.1%) de frigoríficos exportadores (cabe destacar que éstos también abastecen el mercado local con parte de su producción). Las muestras representaron animales de todas las categorías (toro, novillo, ternero, vaca, vaquillona), sacrificados mediante faena convencional o ritual, y con o sin intervención post faena.

El muestreo fue realizado en frigoríficos de 14 departamentos (Artigas, Canelones, Cerro Largo, Colonia, Durazno, Flores, Lavalleja, Maldonado, Paysandú, Rocha, San José, Salto, Soriano, Tacuarembó) durante un total de 97 visitas. Las muestras de las medias canales seleccionadas fueron tomadas 24 horas posterior al sacrificio, encontrándose enfriadas a 4°C en la cámara de maduración. La toma de las muestras se realizó mediante el pasaje de esponjas estériles “Whirl-Pak® Hydrated Speci-Sponge®” (Whirl-Pak, USA), por la cara externa e interna de las medias canales, cubriendo una superficie mínima de 4000 cm² [109]. Las muestras rotuladas fueron almacenadas en cajas isotérmicas con refrigerantes y enviadas al Laboratorio Tecnológico del Uruguay para su procesamiento dentro de las 24 horas

posteriores al muestreo.

4.1.1. Recolección de datos sobre las variables de interés

En el momento de la toma de la muestra se relevó información detallada de la muestra, incluyendo: número de dientes del animal faenado, categoría animal según definiciones de INAC (novillo, toro, vaca, vaquillona), tipo de alimentación previo a la faena (corral o pasto), declaración de aplicación de intervenciones antimicrobianas posterior al sacrificio (*steam vacuum* o ácido láctico, por ejemplo), presencia de pelos visibles, tipo de faena (Kosher o clásica), tipo de frigorífico (exportación o abasto) y estacionalidad del sacrificio animal (meses cálidos –de octubre a marzo- o fríos –de abril a setiembre-).

4.2 Procesamiento de las muestras en el laboratorio de Microbiología

4.2.1. Enriquecimiento

Las esponjas fueron hidratadas con 100 ml del medio Modified Tryptone Soy Broth (mTSB, Neogen, USA) previamente termostatizado en baño a 45°C, mezcladas vigorosamente a mano por 2 minutos para favorecer el contacto con el medio de cultivo (Figura 10) e incubadas en aerobiosis durante 18-22 horas a 42 ± 1 °C.



Figura 10. Esponja empleada para la toma de muestra de una media canal hidratada con mTSB.

4.2.2. Tamizaje para genes *stx* y *eae*

Luego de la incubación, los caldos fueron analizados por PCR a tiempo real para detectar la presencia de los genes *stx* y *eae*. Se utilizó el kit comercial “STEC Screening *stx/eae*” (Hygiena, USA) en el equipo Bax® System Q7 (Hygiena, USA), siguiendo las indicaciones del fabricante que se detallan a continuación:

- A. Preparar el reactivo de lisis agregando 150 μL de proteasa (Bax® System Protease, Hygiena, USA) a un frasco con 12 ml de buffer de lisis (System Lysis® Buffer, Hygiena, USA).
- B. Transferir 200 μL de reactivo de lisis preparado a cada tubo y agregar 20 μL de la muestra enriquecida.
- C. Calentar a 37°C durante 20 minutos.
- D. Calentar a 95°C durante 10 minutos.
- E. Enfriar a 2-8°C durante al menos 5 minutos.
- F. Colocar una gradilla para tubos de PCR (que contienen todos los reactivos liofilizados para llevar a cabo la reacción) en un bloque de enfriamiento de PCR refrigerado (2-8 °C).

- G. Transferir 30 μL del extracto obtenido en el del paso E a los tubos de PCR, luego sellar con tapas ópticas planas y cargar con el equipo previamente configurado para llevar adelante la detección de los genes *stx* y *eae*.

4.2.3. Aislamiento de STEC a partir de muestras positivas para *stx* y *eae*

Los caldos positivos a los genes *stx* (*eae* positivos y negativos), fueron sembrados por agotamiento en cuatro placas de cultivo; dos con medio MacConkey (Oxoid, UK) y dos con medio Eosin Methylene Blue Agar Levine (EMB-Levine, Oxoid, UK) divididas en 6 partes, con el objetivo de obtener la mayor cantidad de colonias aisladas posible. Para la siembra se colocó 1 ml de los caldos enriquecidos positivos en un tubo de microcentrífuga y se centrifugó a máxima velocidad durante cinco minutos. Se descartó el sobrenadante y el sedimento resuspendido fue sembrado con ansa estéril en un sexto de una de las placas de MacConkey, obteniéndose así una “zona de descarga”. Tomando otra ansa estéril se tocó la zona de descarga y se estrió desde ésta hacia la zona siguiente en sentido horario. Utilizando esta misma ansa se sembró sucesivamente la totalidad de las 6 partes hasta completar la superficie de placa. Se continuó sembrando con esta ansa las 6 partes de la placa de Medio EMB-Levine, luego la otra placa de MacConkey y la última placa de EMB-Levine. Luego de sembradas las cuatro placas, se incubaron a 37 ± 1 °C durante 24 horas (Figura 11). Al mismo tiempo, una alícuota de los caldos positivos fue conservada a -80°C para posibles estudios posteriores.

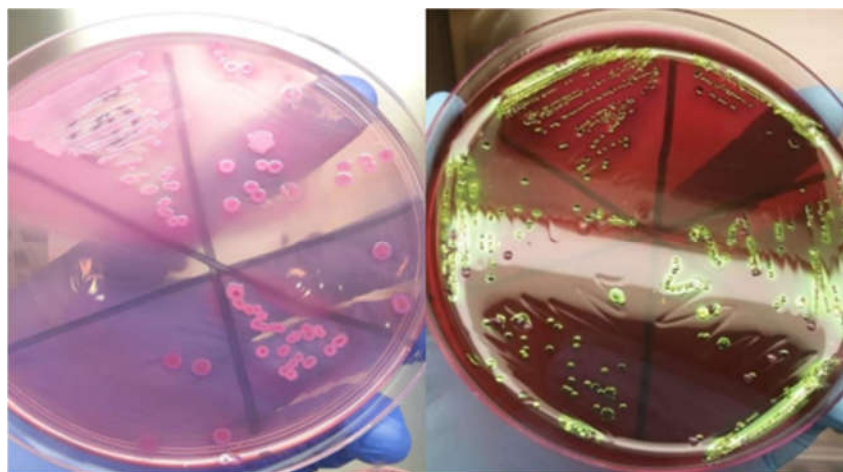


Figura 11. a) Placa de agar MacConkey sembrada a partir de caldo positivo para *stx* por agotamiento. **b)** Placa de EMB-Levine sembrada por agotamiento. Se observan las colonias típicas de *Escherichia coli* con brillo metálico verdoso con centro púrpura oscuro.

Luego de la incubación, se realizó una PCR multiplex a tiempo final buscando los genes *stx1*, *stx2* y *eae* en extractos de ADN de la zona de descarga. Para esto se realizó la lisis bacteriana de una ansada de arrastre de esta zona de la siguiente manera:

- A. Suspender el cultivo en 150 μ L de solución de lisis (TE 1X-Tritón X100 al 1%)
- B. Llevar a ebullición a 100°C durante 5-10 minutos
- C. Enfriar a 4°C por 10 minutos
- D. Centrifugar a 12.000 rpm por 10 minutos
- E. Conservar a -20°C 100 μ L del sobrenadante para usar como molde en las reacciones de amplificación.

Las placas fueron conservadas a 4°C para tomar colonias individuales en caso de resultado positivo para *stx* (solo o combinado con *eae*).

La reacción de PCR utilizada fue realizada utilizando los cebadores descritos por Paton & Paton [110]. La mezcla de reacción se realizó combinando 12.5 μ L de la enzima ImmoMix™ Red 2x (Meridian Bioscience, USA), 1.5 μ L de una solución de mezcla de los cebadores (Tabla 3) de modo de llegar a una concentración final en la reacción de 200 μ M, 4 μ L de UltraPure DNase/RNase-Free Distilled Water (Invitrogen, USA) y 3 μ L de ADN molde. En cada reacción se utilizó como control positivo el extracto de la cepa de referencia *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 43895 (ATCC, USA) y como control negativo buffer de lisis sin inocular.

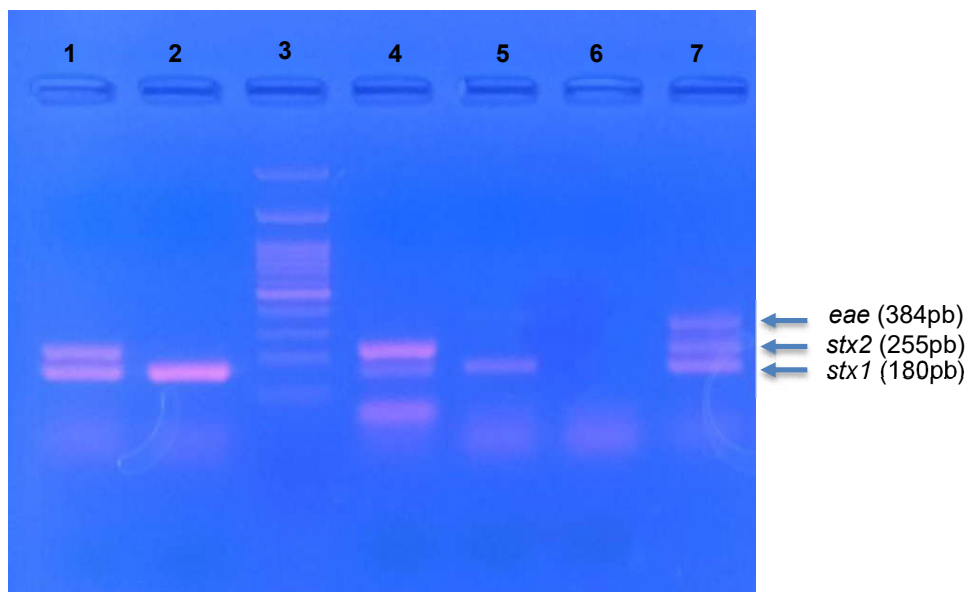
Nombre primer	Secuencia 5'-3'	Tamaño del amplicón (bp)
<i>stx1F</i>	ATAAATCGCCATTCGTTGACTAC	180
<i>stx1R</i>	AGAACGCCCCACTGAGATCATC	
<i>stx2F</i>	GGCACTGTCTGAACTGCTCC	255
<i>stx2R</i>	TCGCCAGTTATCTGACATTCTG	
<i>eaeA F</i>	GACCCGGCACAAGCATAAGC	384
<i>eaeA R</i>	CCACCTGCAGCAACAAGAGG	

Tabla 4. Secuencias de los cebadores utilizados para la detección de *stx1*, *stx2* y *eae* por PCR a tiempo final [110].

Las reacciones de PCR fueron realizadas en un termociclador T100 Thermal Cycler de Biorad (Biorad, USA) con los ciclos de desnaturalización, hibridación, extensión y pasos previos y posteriores, descritos en la Tabla 5.

El producto de PCR fue visualizado en gel de agarosa al 2% (2 g de agarosa cada 100 mL de TAE 1X) con GelRed® (Biosalab, España) al 10% (10 μ L cada 100 mL de gel) incorporado para su lectura e interpretación bajo luz UV (Figura 7). Se utilizó como marcador de peso molecular 6 μ L (1 μ L de marcador, 1 μ L de buffer corrida, 4 μ L de H₂O) de HyperLadder™ 100bp (Bioline, UK).

En cada pocillo se sembraron directamente 6 μ L del producto de PCR, control positivo y control negativo. La corrida del gel se realizó en una cuba de electroforesis horizontal marca Cleaver Scientific (UK) a 90V por 55 minutos.



Temperatura	Tiempo	N° de ciclos
95°C	15 min	x1
95°C	1 min	x10
65°C	2 min	
72°C	1 min 30 seg	
95°C	1 min	x4
64°C (Disminuir un grado cada ciclo)	2 min	
72°C	1 min 30 seg	
95°C	1 min	x10
60°C	2 min	
72°C	1 min 30 seg	
95°C	1 min	x11
60°C	2 min	
72°C	1 min 30 se g (aumentar 6 seg/ ciclo)	

Tabla 5. Ciclo de temperaturas utilizado para la detección de *stx1*, *stx2* y *eae* por PCR a tiempo final.

En aquellas muestras que la PCR de la zona de descarga presentó un resultado positivo para *stx1* y/o *stx2*, se seleccionaron hasta 50 colonias de las de las cuatro placas previamente sembradas a partir del caldo (2 de MacConkey y 2 de EMB-Levine) y conservadas a 4°C. Estas colonias se sembraron en una única placa de MacConkey con que se incubó a $37\pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas (Figura 13).

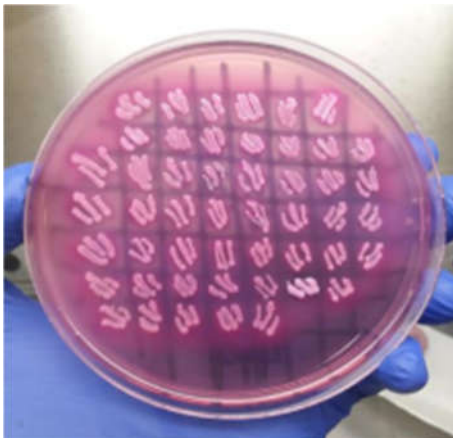


Figura 13. Placa de MacConkey con 50 colonias seleccionadas de placa con zona de descarga positiva.

Posterior al aislamiento se realizó PCR a tiempo final de las colonias organizadas en 5 pooles de 10 colonias cada uno. Tanto la lisis, como la PCR y el gel de electroforesis de los pooles, se realizaron según lo descrito previamente en esta sección. Para cada muestra, se optó por analizar las colonias individuales de los pooles que presentaban un perfil genético diferente (*stx1*, *stx2*, *stx1+eae*, *stx2+eae* o *stx1+stx2+eae*). El objetivo fue poder obtener suficientes colonias que representaran la diversidad de las STEC presentes en las muestras. Así, una vez seleccionados los pooles, se realizó la PCR individual de las diez colonias que los integraban. Tanto la lisis, como la PCR multiplex a tiempo final y el gel de electroforesis de las colonias individuales, se realizaron según lo descrito previamente en esta sección.

Las colonias positivas para al menos uno de los genes *stx*, fueron aisladas en Tryptona Soya Agar (TSA, Oxoid, UK) e incubadas por 24 horas a 37±1°C, para chequear su pureza y tener cultivos frescos para realizar la prueba de indol y congelarlas.

La prueba de indol se realizó con el RapidID™ Spot Indole Reagent (Thermo Fisher Scientific, USA). Aquellas colonias indol positivas, coloración azul azul-verdosa al poner en contacto con papel de filtro impregnado del reactivo, eran consideradas presuntivas *Escherichia coli*.

Para el congelamiento se realizó el arrastre del crecimiento del TSA del aislamiento de interés a microtubos estériles conteniendo 1.5 mL de una mezcla Tryptone Soy Broth (TSB, Oxoid, UK):Glicerol (J.T. Baker, USA) en proporción 7:3.

4.2.4. Detección y aislamiento de *Escherichia coli* O157:H7

En los caldos de enriquecimiento positivos para los genes *stx* y *eae* (ambos genes presentes en el mismo caldo) se realizó la búsqueda de *Escherichia coli* O157:H7 por PCR en tiempo real empleando el kit comercial “Real-Time *E. coli* O157:H7” (Hygiena, USA) en el equipo Bax® System Q7 (Hygiena, USA), según las indicaciones del fabricante indicadas en el punto 4.2.2 del presente documento. Este kit realiza una PCR multiplex dirigida a los genes que codifican para el antígeno O157 (target W) y el flagelo H7 (target S). A las muestras positivas para el target W, se le realizó una separación inmunomagnética utilizando Dynabeads® anti-*E. coli* O157 (Thermo Fisher Scientific, USA), con siembra posterior en medio cromogénico CHROMagar™ O157 (CHROMagar, Francia) y MacConkey Sorbitol Agar con Cefixime y Telurito (CT-SMAC, Oxoid, UK).

El procedimiento para la inmunoseparación magnética y siembra fue el siguiente:

- A. Realizar una toma de 1mL del Caldo mTSB correspondiente al resultado positivo obtenido por PCR y mezclar en un tubo Eppendorff con 20µl de la suspensión de perlas inmunomagnéticas (previamente vortexear el tubo de Dynabeads hasta resuspender totalmente el sedimento). Agitar aproximadamente 15 segundos en vórtex.
- B. Agitar durante 15 min a 100 rpm a temperatura ambiente.
- C. Colocar el tubo con la mezcla en uno de los orificios de la gradilla imantada. Rotar la gradilla durante 5 minutos aproximadamente hasta observar un precipitado marrón en la pared del tubo (perlas fijadas) y retirar el sobrenadante con precaución. Extraer el tubo de la gradilla.
- D. Realizar tres lavados del “precipitado” con 1 ml de Phosphate Buffered Saline con Tween 20 pH 7.4 (PBS-T20, Merck, Alemania) siguiendo los puntos B y C.
- E. Luego del tercer lavado, resuspender las perlitas lavadas en 90 µL de PBS-T20.
- F. Sembrar 50 µL (hisopar media placa y reaislar en la otra mitad, para romper el complejo perlita-bacteria) a una placa de CHROMagarO157.
- G. Con el volumen restante del punto F preparar una dilución de 10 µL en 90 µL de PBS-T20. De esta suspensión (1:10)
 - dispensar 45 µL en CT-Smac y distribuir con rastrillo estéril
 - dispensar 45 µL en CHROMagar O157 y distribuir con rastrillo estéril
 - preparar la dilución de siembra siguiente
- H. A partir de la suspensión 1:10, preparar una dilución de 10 µL en 90 µL de Wash Buffer. De esta suspensión (1:100)
 - Dispensar 45 µL en CT-Smac y distribuir con rastrillo estéril
 - dispensar 45 µL en CHROMagarO157 y distribuir rastrillo estéril
- I. Incubar las placas a 35±1°C durante 18 a 24 hs.
- J. Pasado el tiempo de incubación observar e interpretar las placas (no se recomienda la lectura de las placas pasadas la 24 hs de incubación):
 - En el medio CHROMagarO157 las colonias típicas son color malva (Figura 14).
 - En el medio CT-SMAC las colonias típicas se caracterizan por ser sorbitol negativas (colonias rosadas transparentes con un centro amarronado – Figura 15)

K. Aislar las colonias típicas en TSA e incubar a $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 18 a 24 horas para confirmar posteriormente

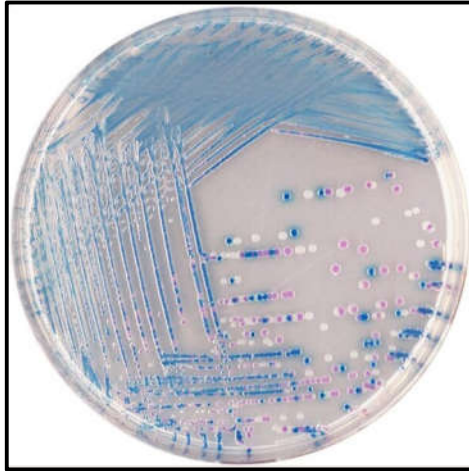


Figura 14. Placa de CHROMagar O157. Las colonias de *Escherichia coli* O157 se ven de color violeta-malva.

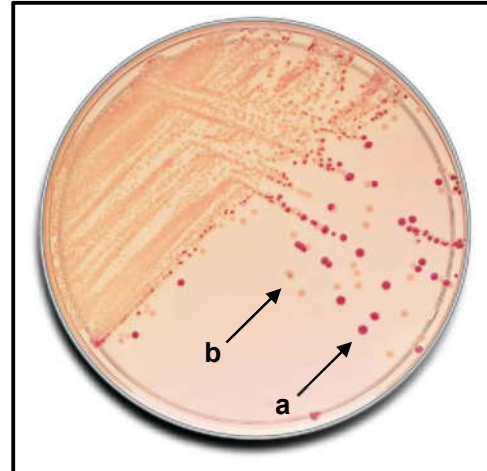


Figura 15. Placa de MacConkey Sorbitol Agar con Cefixime y Telurito. **a)** *Escherichia coli* genérica ATCC 25922, **b)** *Escherichia coli* O157:H7 sorbitol negativa

Las colonias sospechosas aisladas en TSA fueron aglutinadas con el kit comercial “*E. coli* O157 Látex Test Kit” (Thermo Fisher Scientific, USA) según indicaciones del fabricante. En caso de reacción positiva fueron confirmadas nuevamente por PCR usando el kit “Real-Time *E. coli* O157:H7” (Hygiena, USA) y congeladas a -80°C para estudios posteriores.

Para el congelamiento de los aislados se realizó el arrastre del crecimiento en TSA a microtubos conteniendo 1.5 mL de una mezcla Tryptone Soy Broth (TSB, Oxoid, UK):Glicerol (J.T. Baker, USA) en proporción 7:3.

Un esquema del proceso completo del aislamiento de los cultivos puede observarse en la Figura 16.

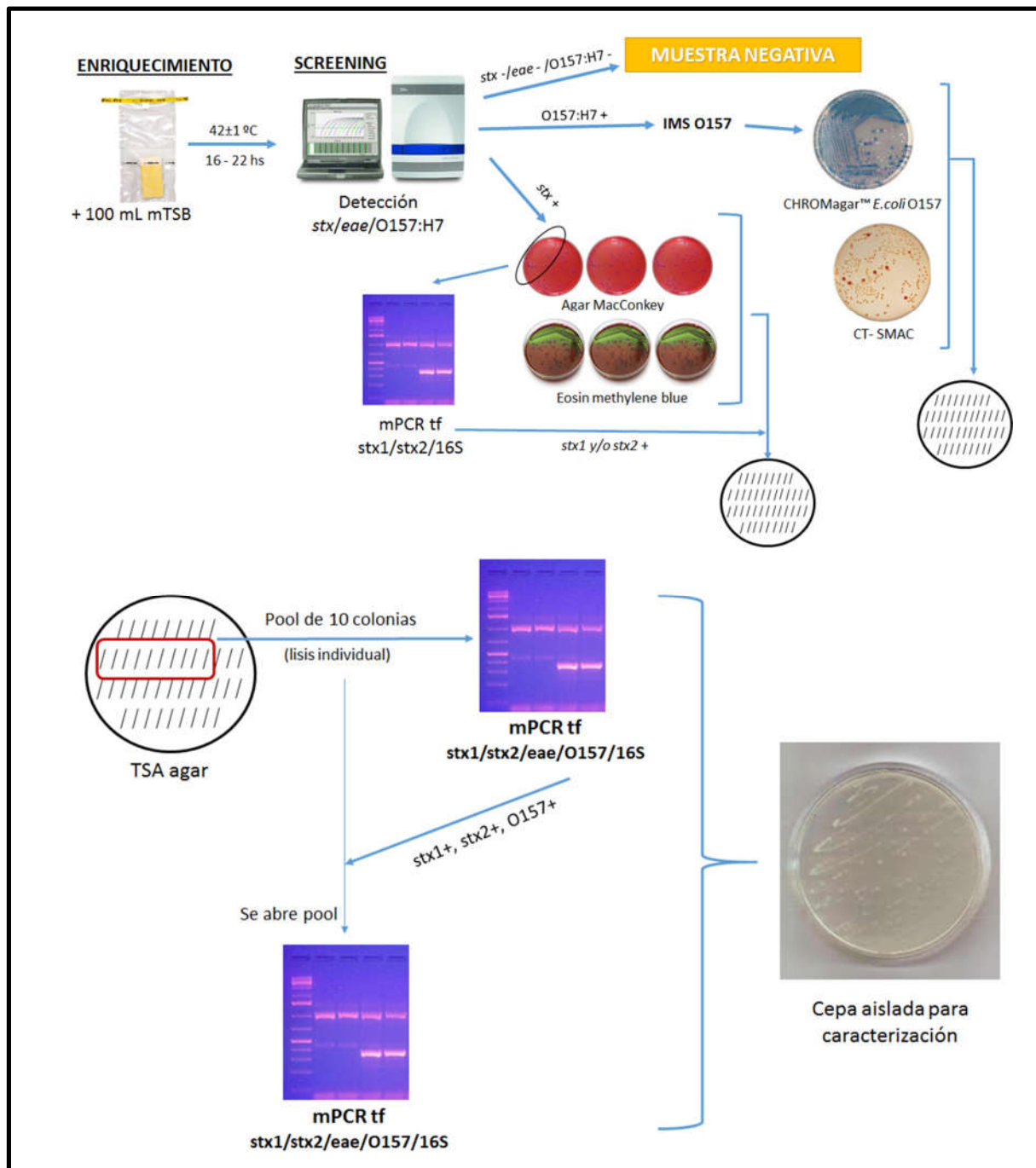


Figura 16. Esquema del proceso completo utilizado para el aislamiento de las colonias a caracterizar.

4.3 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los datos generados a nivel de laboratorio y los de las variables de muestreo estudiadas se realizaron pruebas Chi-cuadrado, test de Fisher y regresión

logística, utilizando el programa PASW Statistics 18 y 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 aportaron 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).

4.4 Selección de aislamientos STEC para su caracterización

Teniendo como limitante el costo de la secuenciación genómica se seleccionaron 50 cepas para analizar fenotípicamente y genotípicamente de modo aleatorio, contemplando cubrir todos los establecimientos positivos en los que se recuperaron cultivos STEC y tomando más cepas para caracterizar en aquellos frigoríficos en los que se obtuvieron mayor cantidad de muestras positivas.

4.5 Caracterización fenotípica

4.5.1. Resistencia antimicrobiana por el procedimiento de Disco difusión en agar (método de Kirby-Bauer)

Las cepas fueron analizadas por la técnica de disco difusión siguiendo las recomendaciones para *Enterobacteriaceae* del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) [111]. Los 14 antibióticos testeados se detallan en la tabla 6. La interpretación también fue realizada en función de los puntos de cortes del CLSI y la cepa *E. coli* ATCC 25922 fue utilizada como control de calidad.

Para realizar la prueba de disco difusión, se preparó una suspensión 0,5 McFarland en suero fisiológico estéril a partir de un cultivo fresco de 18-24 horas en Triptona Soja Agar (TSA,

Oxoid, UK). La concentración se verificó utilizando un densitómetro DEN-1 marca Biosan (Letonia).

Se utilizó un hisopo de algodón estéril para distribuir uniformemente la suspensión preparada, cubriendo toda la superficie de 2 placas de agar Müller Hinton (Oxoid, UK). Luego de absorbida la suspensión en la superficie del medio, y dentro de los 15 minutos, se colocaron los discos de antibióticos dispuestos como se muestra en la Figura 12. Las placas se incubaron invertidas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 16-18 horas.

Código	Antibiótico	Carga	Código	Antibiótico	Carga
AMC	AMPICILINA CLAVULÁNICO	30 μg	CN	GENTAMICINA	10 μg
CRO	CEFTRIAXONE	30 μg	AK	AMIKACINA	30 μg
CXM	CEFUROXIME	30 μg	CIP	CIPROFLOXACINA	5 μg
FOT	FOSMOMICINA	200 μg	IPM	IMIPENEM	10 μg
FOX	CEFOXITINA	30 μg	SXT	TRIMPETOPRIM SULFA	25 μg
CAZ	CEFTAZIDIMA	30 μg	MEM	MEROPENEM	10 μg
FEP	CEFEPIME	30 μg	AMP	AMPICILINA	10 μg

Tabla 6. Antibióticos utilizados en la técnica de disco difusión.

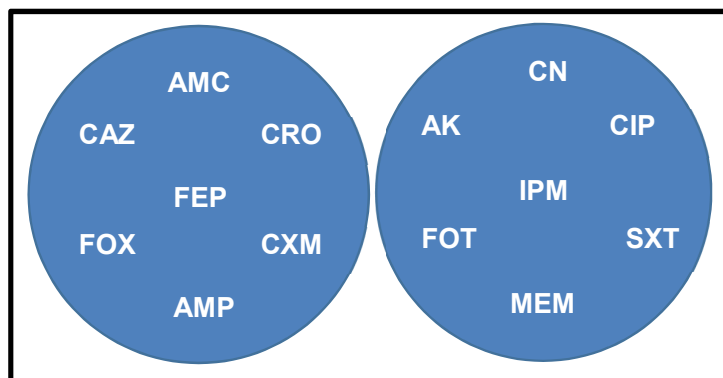


Figura 17. Distribución de discos de antimicrobianos en placas de Müller Hinton.

La interpretación en función del diámetro de los halos de inhibición en las placas se realizó según los criterios de la tabla 7.

Agente antimicrobiano	Categorías interpretativas y puntos de corte de diámetro de zona, mm				Agente antimicrobiano	Categorías interpretativas y puntos de corte de diámetro de zona, mm		
	S	I	R			S	I	R
AMC	≥ 18	14–17	≤ 13		CN	≥ 15	13–14	≤ 12
CRO	≥ 23	20–22	≤ 19		AK	≥ 17	15–16	≤ 14
CXM	≥ 23	15–22	≤ 14		CIP	≥ 31	21–30	≤ 20
FOT	≥ 16	13–15	≤ 12		IPM	≥ 23	20–22	≤ 19
FOX	≥ 18	15–17	≤ 14		SXT	≥ 16	11–15	≤ 10
CAZ	≥ 21	18–20	≤ 17		MEM	≥ 23	20–22	≤ 19
FEP	≥ 25	19–24	≤ 18		AMP	≥ 17	14–16	≤ 13

Tabla 7. Diámetro y puntos de corte de MIC para Enterobacterias. I: Intermedio; R: Resistente; S: Susceptible [112].

La detección de la producción de BLEE se realizó por el test de sinergia colocando entre los discos de CRO y CAZ un disco de AMC como se ve en la figura 18. Se confirma la presencia de BLEE cuando el halo de inhibición del lado del disco de AMC es ≥ 5 mm respecto al del lado sin AMC (efecto huevo o cola de pez).

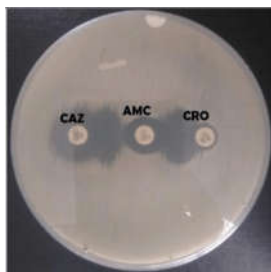


Figura 18. Ejemplo de visualización de detección de BLEE.

4.5.2. Caracterización fenotípica con MicroScan

La determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM) y la identificación bioquímica fue realizada con el empleo del sistema comercial MicroScan autoSCAN-4 (Beckman Coulter Inc., USA) y el panel 66, de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

Los paneles MicroScan están diseñados para determinar la sensibilidad a antimicrobianos arrojando resultados de CIM para más de 20 antimicrobianos, y al mismo tiempo, puede identificar a nivel de especie bacilos Gram negativos aerobios y anaerobios facultativos realizando pruebas convencionales y cromogénicas modificadas para la identificación de fermentadores y no fermentadores. Para las 50 cepas a estudiar se utilizó el “Neg Combo Panel Type 66” que posee una combinación de 34 pruebas bioquímicas y 28 antimicrobianos en distintas concentraciones.

Aquellas cepas en las que se identificó la presencia de algún gen de resistencia (durante la caracterización molecular, ver más adelante) para antimicrobianos no contenidos en el Panel 66, fueron analizadas también con el panel “Neg MIC 44” que contiene 5 antibióticos adicionales (Cloranfenicol, Doripenem, Minociclina, Piperacilina y Tetraciclina). Los valores de corte clínicos se aplicaron de acuerdo con las pautas del CLSI [112].

En la Figura 19 se puede ver una imagen de las distintas pruebas bioquímicas identificatorias (especificadas en la Tabla 8) y antibióticos del panel (Tabla 9), así como su disposición. En la Figura 20 se presenta una imagen del equipo utilizado para la lectura semiautomatizada de las placas.

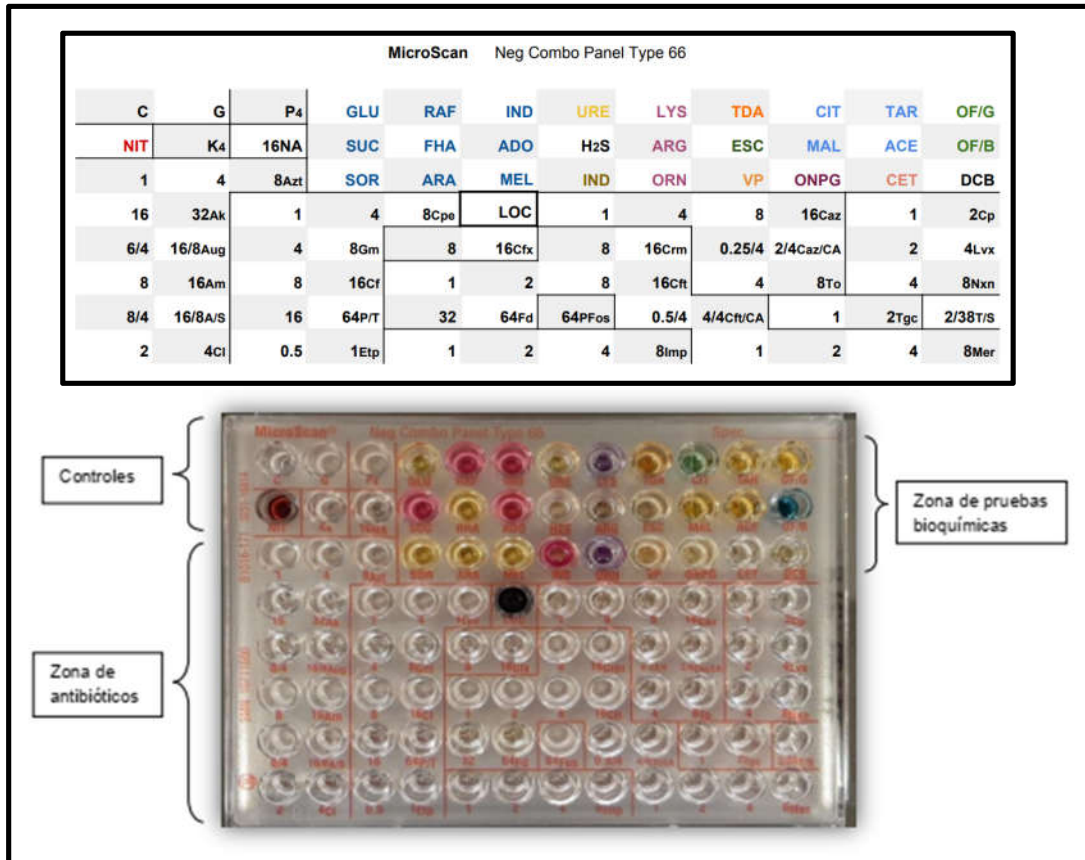


Figura 19. Ilustración de Panel 66 del sistema MicroScan para gram negativos.



Figura 20. MicroScan autoSCAN-4 (Beckman Coulter, Inc; USA).

Tabla 8. Pruebas bioquímicas presentes en el panel Neg Combo Type 66 [113].

Prueba (Código)	Descripción
Fermentación de carbohidratos (GLU, SUC, SOR, RAF, RHA, ARA, INO, ADO, MEL)	La fermentación de un carbohidrato específico produce la formación de ácido y la disminución del pH, detectada por un cambio en el indicador rojo de fenol (color amarillo indica positividad).
Urea (URE)	La enzima ureasa descompone la urea, formando amoniaco. El indicador rojo fenol detecta el aumento de pH resultante, indicado por un color rojo intenso.
Sulfuro de hidrógeno (H₂S)	El gas de sulfuro de hidrógeno se produce a partir de tiosulfato de sodio y reacciona con iones férricos en el medio para producir precipitado negro.
Indol (IND)	El resultado del metabolismo del triptófano da lugar a la formación de indol, que se detecta mediante la adición del reactivo de Kovacs. Si hay indol, se desarrolla un color rojo.
Lisina, arginina, ornitina (LYS, ARG, ORN)	La descarboxilación de estos aminoácidos da lugar a la formación de aminas básicas que se detectan mediante el indicador púrpura de bromocresol.
Triptófano desaminasa (TDA)	Las bacterias capaces de desaminar el triptófano producen ácido indolpirúvico, que reacciona con citrato férrico de amino en el medio después de añadir cloruro férrico para obtener color marrón.
Hidrólisis de esculina (ESC)	La hidrólisis de esculina se detecta mediante citrato férrico de amonio en el medio, que reacciona con los productos hidrolíticos para formar un precipitado negro.
Voges-Proskauer (VP)	La acetona se produce a partir de piruvato de sodio y se indica mediante la formación de un color rojo después de añadir hidróxido de potasio al 40% y alfa naftol al 5%.
Galactosidasa (ONPG)	La β-galactosidasa hidroliza el orto-nitrofenil-β-D-galactopiranosido, que libera el orto-nitrofenol de color amarillo.
Citrato, malonato, acetamida, tartrato (CIT, MAL, ACE, TAR)	El uso de estos sustratos como fuente única de carbono para el metabolismo conlleva un aumento del pH, que se detecta mediante el indicador azul de bromotimol.
Oxidación-fermentación (OF/G)	La oxidación de la glucosa produce la formación de ácido y una disminución de pH, que se detecta mediante un indicador azul de bromotimol. La OF/G se compara con la OF/B (base) para determinar si se ha producido algún ácido.
Nitrato (NIT)	La capacidad de un microorganismo de reducir el nitrato a nitrito se detecta mediante la adición de ácido sulfanílico y, a continuación, N,N-dimetil-alfa-naftilamina, que produce un color rojo en presencia de nitritos.
Cetrimide (CET)	La tolerancia a Cetrimide es demostrada por el crecimiento en el caldo Müller-Hinton suplementado con Cetrimide
Penicilina, Kanamicina, Colistina, Cefalotina, Nitrofurantoina, Tobramicina (P4, K4, Cl4, Cf8, Fd64, To4)	La resistencia a específicas concentraciones de estos antimicrobianos es demostrada mediante crecimiento.

Para la identificación de *E. coli* el MicroScan utiliza los siguientes criterios:

Prueba	Resultado	Prueba	Resultado	Prueba	Resultado	Prueba	Resultado
GLU	+	MEL	V	ESC	-	OF/B	Azul, azul verde, verde
SUC	+	URE	-	VP	-	P4	+
SOR	V	H2S	-	CIT	-	NIT	+
RAF	-	IND	+	MAL	-	DCB	Gris a amarillo
RHA	+	LYS	+	ONPG	+	Cl4	-
ARA	+	ARG	-	TAR	-	Fd64	-
INO	-	ORN	+	ACE	-	Cf8	V
ADO	-	TDA	-	CET	-	K4	V
OF/G	+	To4	-				

Tabla 9. Pruebas bioquímicas identificadoras de *E. coli*. [113] Donde: GLU: Glucosa; SUC: Sacarosa; SOR: Sorbitol; RAF: Rafinosa; RHA: Rhamnosa; ARA: Arabinosa; INO: Inositol; ADO: Adonitol; MEL: Melibiosa; URE: Urea; H₂S: Sulfuro de Hidrógeno; IND: Indol; LYS: Lysina; ARG: Arginina; ORN: Ornitina; TDA: Triptófano desaminasa; ESC: Hidrólisis de esculina; VP: Voges Proskauer; CIT: Citrato; MAL: Malonato; ONPG: Galactosidasa; TAR: Tartrato; ACE: Acetramida; CET: Cetramida; OF/G: Oxidación/Fermentación; P4: Penicilina; NIT: Nitrito; Cl₄: Colistina; Fd₆₄: Nitrofurantoina; Cf₈: Cefalotina; K₄: Kanamicina; To₄: Tobramicina

Los antimicrobianos utilizados y su concentración se muestran en la tabla 10. Se consideró multirresistencia si una cepa aislada presentaba resistencia a tres o más antibióticos de diferentes clases. Las cepas intermedias se clasificaron como resistentes.

Antimicrobiano	Clase según OIE	Concentración (µg/mL)
Ácido Nalidíxico	Quinolona	16
Amikacina	Aminoglucósidos	16-32
Amox/Ác. clav	Penicilinas	8/4-16/8
Ampicilina	Penicilinas	8-16
Amp/Sulbactam	Penicilinas	8/4-16/8
Aztreonam	Penicilinas	1, 4-8
Cefepima	Cefalosporinas 3-4	1, 4-8
Cefotaxima	Cefalosporinas 3-4	1-2, 8-16
Cefotaxima/Ác. Clavulánico	Cefalosporinas 3-4	0.5/4, 4/4
Cefoxitina	Cefalosporinas 1-2	8-16
Ceftazidima	Cefalosporinas 3-4	1, 4-16
Ceftazidima/Ác. Clavulánico	Cefalosporinas 3-4	0.25/4, 2/4
Cefuroxima	Cefalosporinas 1-2	8-16
Cefalotina	Cefalosporinas 1-2	8-16
Ciprofloxacina	Quinolonas	1-2
Colistina	Polipéptido cíclico	2-4
Ertapenem	Carbapenem	0.5-1
Fosfomicina	Ac. Fosfórico	64
Gentamicina	Aminoglucósidos	4-8

Antimicrobiano	Clase según OIE	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)
Imipenem	Carbapenem	1-8
Levofloxacin	Quinolonas	2-4
Meropenem	Penicilinas	1-8
Nitrofurantoina	Nitrofuranos	32-64
Norfloxacin	Quinolonas	4-8
Piperacilina	Penicilinas	16-64
Piperacilina Tazobactam	Penicilinas	16, 64
Tigeciclina	Tetraciclinas	1-2
Tobramicina	Aminoglucósidos	4-8
Trimet/Sulfa	Sulfonamidas + diaminopirimidina	2/38

Tabla 10. Antibióticos presentes en el panel "Neg Combo Panel Type 66".

4.5.3. Serotipificación por aglutinación

Los serotipos se determinaron en la Universidad Nacional Autónoma de México, mediante el ensayo de aglutinación clásico de Ørskov y Ørskov en placas de microtitulación de 96 pocillos, y sueros de conejo (SERUNAM, México) obtenidos contra 187 antígenos somáticos y 53 antígenos flagelares de *E. coli* [114].

4.6 Caracterización genómica

4.6.1. Secuenciación genómica completa

Los 50 aislados seleccionados se descongelaron y se inocularon en placas de agar TSA. Después de una incubación durante la noche a $37\pm 1^\circ\text{C}$, se seleccionaron cinco colonias morfológicamente idénticas del cultivo puro y el ADN genómico fue extraído y purificado utilizando el DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las bibliotecas genómicas fueron creadas con el TruSeq Nano DNA Kit - 350pb library (Illumina, USA) y la secuenciación fue realizada usando la plataforma NovaSeq 150PE de Illumina en Macrogen Inc. (Seoul, Corea del Sur).

4.6.2. Trabajo manual con las secuencias

4.6.2.1. Ensamblado de contigs

La calidad de las lecturas crudas obtenidas de Macrogen fueron analizadas con FastQC [115]. Las principales características de los datos que se tuvieron en cuenta fueron:

- **Secuencias totales**: Recuento del número total de secuencias procesadas.
- **Largo de la secuencia**: Proporciona la longitud de la secuencia más corta y más larga del conjunto. Si todas las secuencias tienen la misma longitud, solo se informa un valor.
- **Calidad de la secuencia base**: Buen indicador general de la calidad de los datos. Debería permanecer principalmente en verde, sin embargo, la calidad disminuirá a lo largo de la lectura. Valores mayores que 30 son considerados de buena calidad para lecturas de Illumina.
- **Contenido de secuencia base**: La frecuencia base de cada nucleótido debe reflejar el contenido de GC, con $f(A)=f(T)$ y $f(G)=f(C)$. La expectativa es que estas líneas permanezcan horizontales y parejas a lo largo de la lectura.
- **GC de secuencia base**: La distribución anormal de GC es un buen indicador de contaminación. El perfil de GC debe ajustarse al contenido esperado para las especies de interés, con una distribución uniforme y sin picos.

- **Contenido de base N:** El exceso de bases N a menudo puede indicar un problema con la secuenciación.
- **Niveles de duplicación de secuencias:** La duplicación puede sugerir artefactos generados durante la preparación de la biblioteca/amplificación por PCR.
- **Contenido de adaptadores:** Evalúa la proporción de adaptadores de Illumina presentes en los datos

Las posiciones de baja calidad fueron removidas utilizando Sickle (descartando lecturas con una calidad <28 y aquellas menores de 20pb) [116] y posteriormente, las lecturas fueron ensambladas *de novo* en contigs usando Velvet en 2 pasos. El primero, velveth, hizo la conversión de las lecturas en k-mers utilizando una tabla hash, y el segundo, velvetg, ensambló los k-mers superpuestos en contigs a través de un gráfico de Bruij [117].

Los pasos y comandos utilizados para estas etapas, tomando como entrada los archivos *.fastq.gz* enviados por MacroGen Inc., se listan en la Tabla 11.

>> sickle pe -g -t sanger -f Sample_1.fastq.gz -r Sample_2.fastq.gz -o Sample_1_trim.fastq.gz -p Sample_2_trim.fastq.gz -s Sample_singles.fastq.gz -q 28
- Verificar calidad de las secuencias en FastQC
>> velveth Sample.31 31 -shortPaired -fastq -separate ~/Sample_1_trim.fastq.gz ~/Sample_2_trim.fastq.gz
>> velvetg Sample.31 -exp_cov auto -min_contig_lgth 200 -cov_cutoff auto -ins_length 350

Tabla 11. Pasos y comandos utilizados para procesar las lecturas de MacroGen con el objetivo de obtener los contigs de las distintas secuencias.

El programa Velvet toma las lecturas cortas, remueve los errores y luego produce contigs únicos de alta calidad. A continuación, utiliza las lecturas emparejadas y lecturas largas, cuando estén disponibles, para identificar las áreas repetidas entre contigs [117]. Luego de corrido el programa se vierten determinados parámetros que dan idea de la calidad del resultado obtenido:

- **Nodos:** Cantidad de contigs obtenidos

- **n50**: Longitud de los contigs que contienen el 50% del ensamblaje. Cuanto mayor es este parámetro, mejor la calidad del ensamblado
- **Máx**: Longitud del contig más largo
- **Total**: Tamaño total del ensamblaje
- **Lecturas usadas**: Proporción de lecturas utilizadas
- **Lecturas totales**: Total de lecturas disponibles

4.6.2.2. Búsqueda de genes de virulencia, resistencia antimicrobiana, serotipificación molecular y determinación del secuenciotipo (MLST y cgMLST).

Se utilizó Virulence Finder 2.0 para buscar genes de virulencia y ResFinder 4.1 para identificar los genes de resistencia, estableciendo un umbral de identidad del 90 % y un 60 % de superposición mínima de longitud de genes a partir de los contigs generados utilizando Velvet como se describió más arriba [118,119,120,121]. La subtipificación de los genes *stx* y factores de virulencia adicionales (factor de adherencia Efa1 (*efa1*), hemaglutinina LAA (*hes*), proteína de membrana externa A (*ompA*), adhesina de autoaglutinación STEC (*saa*), un autotransportador que contribuye a la formación de biopelículas (*sab*) y una proteína asociada a la actividad ureasa (*ureC*)) se buscaron mediante PCR *in silico*, utilizando IPCress [122] y los cebadores descritos en la tabla 12.

La herramienta ResFinder4.1 del “Center for Genomic Epidemiology” toma el genoma ensamblado o los contigs de las distintas muestras y los compara frente a su base de datos (curada constantemente por Frank Møller Aarestrup), los 95 antimicrobianos presentes en ésta al momento del estudio se muestran en la tabla 13.

Gen diana	Primer	Secuencia (5'-3')	Tamaño amplicón (bp)	Referencia	
<i>stx1a</i>	stx1a-F1	CCTTTCCAGGTACAACAGCGGTT	478	[123]	
	stx1a-R2	GGAAACTCATCAGATGCCATTCTGG			
<i>stx1c</i>	stx1c-F1	CCTTTCCTGGTACAACGCGGTT	252		
	stx1c-R1	CAAGTGTTGTACGAAATCCCCTCTGA			
<i>stx1d</i>	stx1d-F1	CAGTTAATGCGATTGCTAAGGAGTTTACC	203		
	stx1d-R2	CTCTTCCTCTGGTTCTAACCCCATGATA			
<i>stx2a</i>	stx2a-F2	GCGATACTGRGBACTGTGGCC	349 347		
	stx2a-R3	CCGKCAACCTTCACTGTAAATGTG			
	stx2a-R2	GGCCACCTTCACTGTGAATGTG			
<i>stx2b</i>	stx2b-F1	AAATATGAAGAAGATATTTGTAGCGGC	251		
	stx2b-R1	CAGCAAATCCTGAACCTGACG			
<i>stx2c</i>	stx2c-F1	GAAAGTCACAGTTTTTATATAACAACGGGTA	177		
	stx2c-R2	CCGGCCACYTTTACTGTGAATGTA			
<i>stx2d</i>	stx2d-F1	AAARTCACAGTCTTTATATAACAACGGGTG	179 280		
	stx2d-R1	TTYCCGGCCACTTTTACTGTG			
	stx2d-R2	GCCTGATGCACAGGACTGGAC			
<i>stx2e</i>	stx2e-F1	CGGAGTATCGGGGAGAGGC	411		
	stx2e-R2	CTTCCTGACACCTTACAGTAAAGGT			
<i>stx2f</i>	stx2f-F1	TGGGCGTCATTCCTGGTTG	424		
	stx2f-R1	TAATGGCCGCCCTGTCTCC			
<i>stx2g</i>	stx2g-F1	CACCGGGTAGTTATATTTCTGTGGATATC	573		
	stx2g-R1	GATGGCAATTCAGAATAACCGCT			
<i>aggR</i>	aggR-F	GAATCGTCAGCATCAGCTACA	102		[124]
	aggR-R	CCTAAAGGATGCCCTGATGA			
<i>aaiC</i>	aaiC-F	CATTTACGCTTTTTTACAGGAAT	160		
	aaiC-R	CCTGATTTAGTTGATCCCTACG			
<i>efa1</i>	efa1F	GAGACTGCCAGAGAAAG	479		[125]
	efa1R	GGTATTGTTGCATGTTTCAG			
<i>hes</i>	hes_det1	CAACCAGCGTCTTATCGAT	350	[126]	
	hes_det2	CGGTTGTTTTCTGGTGAAC			
<i>ompA</i>	ompAF	TTTTGGATGATAACGAGG	1156	[127]	
	ompAR	TGCTGGGTAAGGAATAAC			
<i>saa</i>	SAADF	CGTGATGAACAGGCTATTGC	119	[128]	
	SAADR	ATGGACATGCCTGTGGCAAC			
<i>sab</i>	LH0147-f	GGTGGATACAGCAGGTAATG	163	[129]	
	LH0147-r	TATCTACCACCTGCTATCG			
<i>ureC</i>	ureCF	TCTAACGCCACAACCTGTAC	397	[130]	
	ureCR	GAGGAAGGCAGAATATTGGG			

Tabla 12. Cebadores de PCR utilizados para la detección de genes de virulencia o adhesión de STEC por PCR in-silico. R: A/G, B: G/T/C, K: G/T, Y: C/T.

Antimicrobiano	Clase	Antimicrobiano	Clase
amikacin	Aminoglucósido	imipenem	Beta-lactámico
amoxicillin	Beta-lactámico	isepamicin	Aminoglucósido
amoxicillin+clavulanic acid	Beta-lactámico	kanamycin	Aminoglucósido
ampicillin	Beta-lactámico	kanamycin a	Aminoglucósido
ampicillin+clavulanic acid	Beta-lactámico	kasugamycin	Aminoglucósido
apramycin	Aminoglucósido	lincomycin	Lincosamida
arbakacin	Aminoglucósido	linezolid	Oxazolidinona
astromicin	Aminoglucósido	lividomycin	Aminoglucósido
azithromycin	Macrólido	meropenem	Beta-lactámico
aztreonam	Beta-lactámico	metronidazole	Nitroimidazol
benzylkonium chloride	Amonio cuaternario	minocycline	Tetraciclina
butiromycin	Aminoglucósido	mupirocin	Ácido pseudomónico
butirosin	Aminoglucósido	nalidixic acid	Fluoroquinolona
carbomycin	Macrólido	neomycin	Aminoglucósido
cefepime	Beta-lactámico	netilmicin	Aminoglucósido
cefixime	Beta-lactámico	oleandomycin	Macrólido
cefotaxime	Beta-lactámico	paromomycin	Aminoglucósido
cefotaxime+clavulanic acid	Beta-lactámico	penicillin	Beta-lactámico
cefoxitin	Beta-lactámico	piperacillin	Beta-lactámico
ceftazidime	Beta-lactámico	piperacillin+clavulanic acid	Beta-lactámico
ceftazidime+avibactam	Beta-lactámico	piperacillin+tazobactam	Beta-lactámico
ceftriaxone	Beta-lactámico	pristinamycin ia	Estreptogramina b
cephalothin	Beta-lactámico	pristinamycin iia	Estreptogramina a
cephalotin	Beta-lactámico	quinupristin	Estreptogramina b
cetylpyridinium chloride	Amonio cuaternario	quinupristin+dalfopristin	Estreptogramina a
chloramphenicol	Fenicol	ribostamycin	Aminoglucósido
chlorhexidine	Amonio cuaternario	rifampicin	Rifamicina
ciprofloxacin	Fluoroquinolona	sisomicin	Aminoglucósido
clindamycin	Lincosamida	spectinomycin	Aminociclitol
colistin	Polimixina	spiramycin	Macrólido
dalfopristin	Estreptogramina a	streptomycin	Aminoglucósido
dibekacin	Aminoglucósido	sulfamethoxazole	Antagonista de la vía del folato
doxycycline	Tetraciclina	teicoplanin	Glicopéptido
ertapenem	Beta-lactámico	telithromycin	Macrólido
erythromycin	Macrólido	temocillin	Beta-lactámico
ethidium bromide	Amonio cuaternario	temperature	Calor
florfenicol	Fenicol	tetracycline	Tetraciclina
fluoroquinolone	En desarrollo	tiamulin	Pleuromutilina
formaldehyde	Aldehído	ticarcillin	Beta-lactámico
fortimicin	Aminoglucósido	ticarcillin+clavulanic acid	Beta-lactámico
fosfomicin	Fosfomicina	tigecycline	Tetraciclina
fusidic acid	Antibacteriano esteroideo	tobramycin	Aminoglucósido
g418	Aminoglucósido	trimethoprim	Antagonista de la vía del folato
gentamicin	Aminoglucósido	tylosin	Macrólido

Antimicrobiano	Clase	Antimicrobiano	Clase
gentamicin c	Aminoglucósido	unknown beta-lactam	Beta-lactámico
hydrogen peroxide	Peróxido	vancomycin	Glicopéptido
hygromycin	Aminoglucósido	virginiamycin m	Streptogramina a
		virginiamycin s	Streptogramina b

Tabla 13. Antimicrobianos presentes en la base de datos del ResFinder4.1.

También se utilizaron las herramientas web del “Center for Genomic Epidemiology” (<https://www.genomicepidemiology.org/>) para evaluar la caracterización molecular *in-silico* de las cepas secuenciadas. El secuenciotipo se determinó usando MLST Finder 2.0 contra el set de *E. coli* #1, que incluye los genes que codifican para la adenilato quinasa (*adk*), fumarato hidratasa (*fumC*), ADN girasa (*gyrB*), isocitrato/isopropilmalato deshidrogenasa (*icd*), malato deshidrogenasa (*mdh*), adenilosuccinato deshidrogenasa (*purA*) y genes del motivo de unión ATP/GTP (*recA*) [131].

Por otro lado, se identificó el core genome MLST - cgMLST de cada aislado utilizando la herramienta cgMLSTFinder 1.2. Este esquema extiende el concepto del MLST a una escala genómica, cubriendo más de 240.000 genes estrechamente relacionados. Al igual que con MLST convencional, a cada secuencia única en cada locus se asigna un número de alelo, lo que permite la variedad de análisis desarrollados para MLST que utilizan perfiles numéricos [132,133].

La serotipificación molecular se realizó con Serotype Finder 2.0 utilizando un umbral de identidad del 85 % con una longitud mínima del 60 % [134].

4.6.2.3. Identificación de profagos y plásmidos

Las secuencias de profagos presentes en el genoma de las cepas en estudio fueron detectadas utilizando la herramienta “Phage Search Tool Enhanced Release - PHASTER”, que identifica profagos intactos, cuestionables e incompletos, clasificados por puntuaciones >90, 70–90 y <70, respectivamente [135,136]. La búsqueda de replicones de plásmidos se realizó con PlasmidFinder 2.1 del CGE [119,137] estableciendo una identidad mínima de 95% y una cobertura del 60%.

4.6.2.4. Filogrupos con ClermontTyping

Las especies de *E. coli* se pueden dividir en siete filogrupos principales denominados A, B1, B2, C, D, E y F. Esta identificación resulta relevante para estudios epidemiológicos ya que los filogrupos pueden atribuirse a hospederos específicos. Para esta clasificación Clermont y sus colegas han desarrollado ensayos de PCR que permiten su categorización. A partir de la creciente disponibilidad de secuencias genómicas completas, Beghain *et al.* han desarrollado el método ClermontTyping y su interfaz web “ClermontTyper” (<http://clermonttyping.iamersearch.center/>) que permite asignar una secuencia de cepa dada a *E. albertii*, *E. fergusonii*, *Escherichia* clades I–V, *E. coli sensu stricto*, así como a los siete filogrupos principales de *E. coli* [138,139]. Es con esta herramienta que se identificó el Clermont Type de las 50 cepas seleccionadas.

4.6.3. Análisis del pangenoma

Los genomas se analizaron con Roary (v3.13.0) a través del servidor Galaxy (<https://usegalaxy.eu/>) para averiguar la similitud de las cepas aisladas y las relaciones entre ellas [140]. Roary es un “pipeline” de alta velocidad, que toma ensamblajes anotados en formato GFF3 producidos por Prokka (v 1.14.6), e identifica qué genes son comunes a todos los aislados y cuáles son únicos en algunas cepas. Este análisis permite identificar [141,142,143]:

- “Core Genoma”: Es el grupo de genes compartidos por todas las cepas en el grupo de estudio (presente en el 95-99% de los genomas). Los “SNP del core genome” son aquellas modificaciones en un solo nucleótido que se encuentran en los genes del core genoma y se utilizan para inferir relaciones entre las cepas.
- “Genoma accesorio”: Es el grupo de genes que no están en todas las cepas. Estos genes pueden estar en una o más cepas. Incluyen los genes “shell” presentes en el 15-95% de cepas y los genes de la “nube” encontrados en menos del 15% de los genomas estudiados. Las bacterias pueden transferir genes horizontalmente a otras bacterias a través de plásmidos, por lo que su genoma accesorio puede ser grande en relación con los de los eucariotas. Los genomas accesorios bacterianos a menudo albergan genes de resistencia.

- El “pan genoma” es la suma de los genomas core y accesorio. Es decir, una combinación de todos los genes que se encuentran en el grupo analizado.

El árbol filogenético fue generado a través de RAxML (v 8.2.12) y visualizado con Phandango (<https://jameshadfield.github.io/phandango/#/>) [144].

4.6.4. Uso de Aries

La plataforma ARIES (Advanced Research Infrastructure for Experimentation in genomicS <https://aries.iss.it>) se desarrolló dentro del marco Galaxy para el uso específico de la secuenciación genómica completa (WGS) en epidemiología molecular. El espacio de trabajo generado por el Istituto Superiore di Sanità - ISS se implementó con los siguientes objetivos declarados [145]:

- Apoyar a los científicos en la investigación genómica de patógenos microbianos, proporcionando en el mismo tiempo, un entorno único de análisis genómico preconfigurado caracterizado por reproducibilidad, transparencia y fácil intercambio de datos, así como una plataforma escalable abierta para implementación de nuevos recursos bioinformáticos.

- Desarrollo de un Sistema de Información para la recolección de datos genómicos y epidemiológicos, datos para permitir la vigilancia basada en la secuenciación de próxima generación (NGS) de enfermedades infecciosas, brotes de origen alimentario y enfermedades en la interfaz animal-humano.

- Desarrollo de “pipelines” analíticas que permiten trabajar con genomas múltiples armonizados en tiempo real y realizar comparaciones para mejorar la detección de conglomerados de casos de contagios y permitir el bio-rastreo global de patógenos.

- Desarrollo de modelos metagenómicos para la detección y tipificación independientes del cultivo de patógenos y el estudio de sus interacciones con la microbiota en muestras humanas, animales y en los vehículos de infecciones.

La mayoría de las herramientas disponibles en ARIES están dedicadas al análisis de genomas bacterianos y particularmente al análisis de los resultados WGS de *E. coli*. Sin embargo, bases

de datos específicas para el análisis de genomas de otras especies bacterianas también están disponibles. En detalle, la tipificación MLST clásica está disponible para *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium difficile* y *Streptococcus pneumoniae*. Además, cgMLST también se puede realizar para *Clostridium difficile*, *Legionella pneumophila*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* y *Staphylococcus aureus*.

El flujo de trabajo utilizado en ARIES que se muestra en la Figura 21 fue disparado utilizando la herramienta “DISCOVER”. Ésta toma archivos fastqsanger únicos o emparejados como entrada y realiza el control de calidad de las secuencias con FastQC [115] seguido de recorte [141], ensamblaje [146,147] y varias herramientas de identificación. La serotipificación de los antígenos O y H, así como la subtipificación de los genes *stx* [148], se obtiene aplicando MMseqs2 a bases de datos específicas [134]. La tipificación de MLST se realizó a través de MentaliST 0.2.4 [149] utilizando los siete genes del Esquema de Achtman para *E. coli* (*adh*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA*, *recA*) de Enterobase [150]. Para la detección de AMR, se utilizó el Buscador de genes de resistencia antimicrobiana del NCBI (AMRFinderPlus) [151]. La tipificación de la virulencia se basa sobre la herramienta patho_typer [152] aplicada a la base de datos “virulence finder” del Center for Genomic Epidemiology [120]. Un resumen de las distintas herramientas de la plataforma se muestra en la Tabla 14 [133].

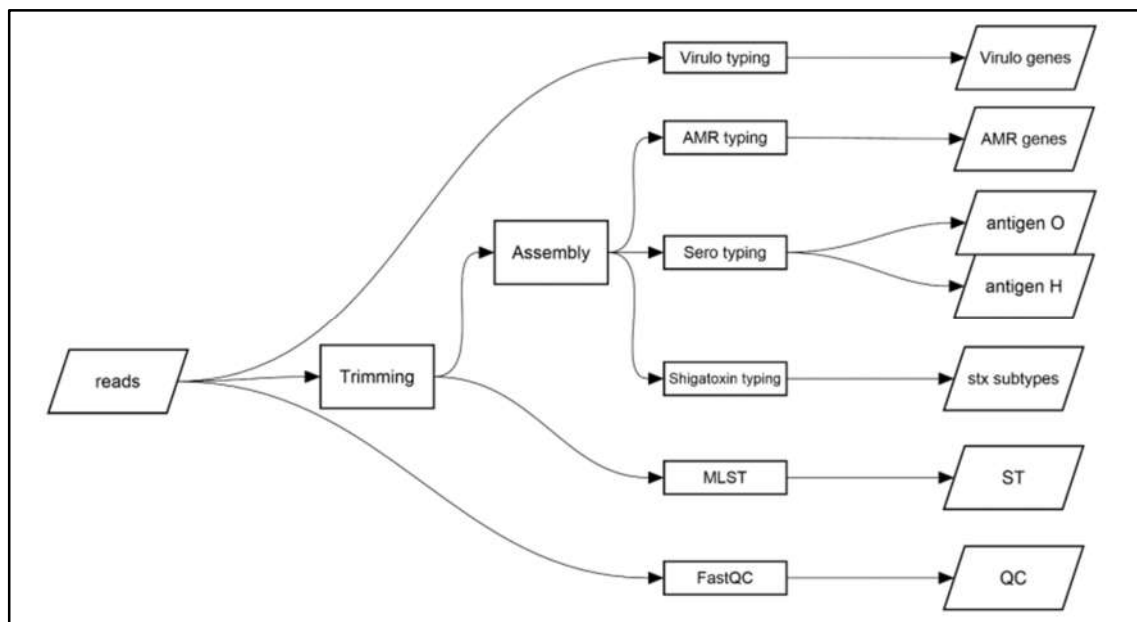


Figura 21. Diagrama de flujo de las herramientas utilizadas en ARIES. Fast QC y la tipificación de virulencia se aplica directamente a las lecturas sin procesar, mientras que los análisis MLST se realizan con MentaliST después de recortar. Luego se utilizan los contigs ensamblados en el resto de las herramientas de tipado [145].

Función	Herramienta disponible en ARIES
NGS Trimming	Trimmomatic [153], FASTQ positional and quality trimming [141]
NGS Assembly	SPAdes [142], SKESA [154], metaSPAdes [155], A5, INNUca [147], Shovill [156]
NGS Mapping	BWA [157], Bowtie2 [158]
NGS Alignment	BLAST [119], MMseqs2 [159], Diamond [160], MAFFT [161], MUMmer [162]
NGS Quality Control	FastQC [115], QUAST [163]
Phylogeny tools	PopPUNK [164], kSNP3 [165], FDA SNP Pipeline [166], MrBayes [167], PhyML [168], IQ-TREE [169]
Allele Call tools	SRST2 [170], MentaLiST [149], MLST [171], chewBBACA [172]
General Typing tools	Virulotyper [152], AMRFinderPlus [173], Resistance Gene Identifier [174]
Specific Typing tools	EURL VTEC WGS PT (E. coli), E coli Serotyper, E coli Virulo typer, E coli Shiga toxin typer

Tabla 14. Herramientas utilizadas por la plataforma ARIES para la caracterización de *E. coli* a partir de secuencias crudas.

4.6.4.1. Asociación filogenética por cgMLST

Para estudiar la relación entre los distintos aislamientos STEC seleccionados se utilizó chewBBACA, un “pipeline” presente en la herramienta Discover V1.1 de ARIES, que crea el esquema de cgMLST y realiza la distinción de alelos de las secuencias codificantes de las distintas secuencias ensambladas. Así, los alelos identificados por chewBBACA corresponden a la potencial codificación de las secuencias, ofreciendo información sobre la correspondencia entre la variabilidad genética identificada y la variabilidad fenotípica. Esto permite hacer un estudio de asociación de los aislamientos con un enfoque gen por gen (GbG) [172]. Luego se utilizó chewTree (Galaxy v1.0) para crear el árbol a partir de los alelos de chewBBACA que se visualizó con la aplicación GrapeTree [175].

4.6.5. Categorización de las cepas STEC seleccionadas de acuerdo al riesgo para la salud según los niveles de FAO/WHO

Para clasificar los aislamientos de STEC no O157 se utilizó un esquema propuesto por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), donde establecieron cinco niveles de riesgo basados

en la combinación de genes de virulencia con el fin de generar un criterio para categorizar el riesgo potencial de enfermedad grave asociada a STEC en los alimentos, y poder dotar a los gestores de riesgos de una herramienta adicional orientadora de evaluación y control [80]. Los distintos niveles, así como la potencial enfermedad se muestran en la Tabla 15.

Tabla 15. Combinación de genes de virulencia y estimación del potencial para causar diarrea (D), diarrea sanguinolenta (DS) y síndrome urémico hemolítico (SUH).

Nivel	Genes presentes	Potencial para causar¹:
1	<i>stx_{2a}</i> + <i>eae/aggR</i>	D/DS/SUH
2	<i>stx_{2d}</i>	D/DS/SUH ²
3	<i>stx_{2c}</i> + <i>eae</i>	D/DS ³
4	<i>stx_{1a}</i> + <i>eae</i>	D/DS ³
5	otros <i>stx</i>	D

Notas: 1. Dependiente también de la susceptibilidad del huésped y otros factores; 2. La asociación con SUH depende de la variante de *stx_{2d}* y de la cepa portadora; 3. Se han reportado subtipos causantes de DS y en raras ocasiones SUH.

5 RESULTADOS

5.1 Distribución de las muestras de medias canales analizadas en función de las variables en estudio

El número total de muestras (n=800) se distribuyó según la categoría de los animales faenados como se muestra en la tabla 16, siendo similar a la representación de la faena nacional registrada en el periodo 2010-2019.

Categoría Animal	Distribución en el muestreo realizado (2018-2020)	Estructura de la faena ROU 2010-2019 [176]
Novillo	58,8%	49,1%
Vacas	24,5%	37,8%
Vaquillonas	16,0%	11,0%
Toros	0,5%	1,5%
Terneros	0,1%	0,6%

Tabla 16. Distribución de las muestras analizadas en función de la categoría animal (2018- 2020).

La distribución de las muestras obtenidas con respecto a las otras variables se detalla en la tabla 17.

Tipo de Frigorífico	Abasto	8%
	Exportación	92%
Estación de muestreo	Fría (abril-setiembre)	50%
	Cálida (octubre-marzo)	50%
Sistema de alimentación	Pasto	89%
	Corral	11%
Con intervención	Si	62%
	No	36%
Tipo de faena	Común	90%
	Kosher	10%
Visualización de pelos	Si	38%
	No	60%

Tabla 17. Distribución del muestreo en función de las variables relevadas durante la visita a planta.

La distribución de las medias canales según categoría animal en función del tipo de frigorífico se muestra en la figura 22.

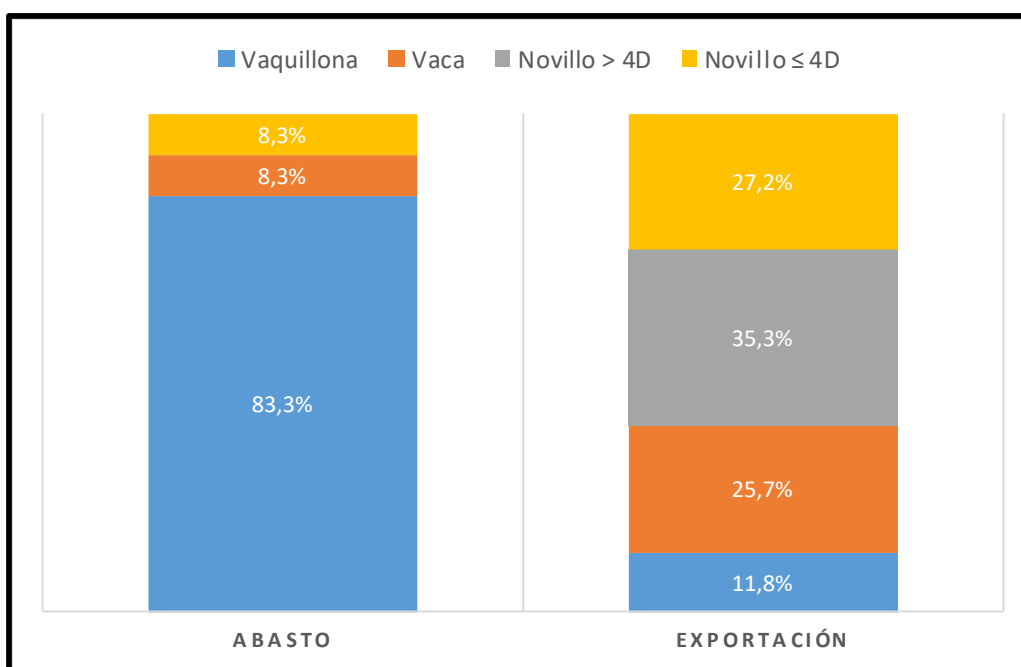


Figura 22. Distribución de la categoría animal de las medias canales en frigoríficos de abasto y exportación.

5.2 Presencia de genes *stx* y *eae* en los caldos de enriquecimiento

Los resultados de la búsqueda de los genes de *stx* y *eae* por PCR en tiempo real en los 800 caldos de enriquecimiento de las muestras fueron los siguientes (Tabla 18):

Resultado	% de muestras positivas (total)
<i>stx+</i>	22,4% (n=179)
<i>eae+</i>	19,1% (n=153)
<i>stx+</i> y <i>eae+</i>	9,1% (n=73)
<i>stx-</i> y <i>eae-</i>	67,6% (n=541)

Tabla 18. Resultados del tamizaje de genes *stx* y *eae* en caldos de enriquecimiento por PCR a tiempo real.

En 29 de los 37 frigoríficos (78,4%) muestreados se obtuvo al menos una muestra *stx* positiva. Es importante resaltar que este resultado refiere al caldo de enriquecimiento, no es posible asociar la presencia de los genes a las bacterias específicamente. Es decir, no es posible saber aún si las señales positivas provienen de la misma cepa, si hay varias cepas portadoras, ni si se trata de genes presentes en *Escherichia coli*.

5.3 Asociación de factores con la presencia de genes *stx* en caldo

A continuación, se presentan los resultados del análisis inferencial realizado de cada uno de los factores (tipo de animal, tipo de alimentación, tipo de frigorífico, época y tipo de faena, intervenciones y presencia de pelos) para evaluar su influencia en la prevalencia de genes *stx* a nivel de caldo, primero de manera independiente y luego mediante un análisis multivariado.

5.3.1. Categoría animal

Se encontró asociación entre la frecuencia de caldos positivos para *stx* y la categoría animal, expresando un valor $p=0.0019$. En la tabla 19 se detalla el porcentaje de muestras positivas para cada de categoría animal a nivel de caldo.

Tabla 19. Porcentaje de caldos positivos a genes *stx* según categoría animal

Categoría Animal(*)	Porcentaje de muestras positivas para genes <i>stx</i>
Vaquillona	33,8% (n = 44/130)
Vaca	17,0% (n = 33/194)
Novillo	21,7% (n = 102/470)

(*) Toros y terneros no fueron incluidos en el análisis ya que representaban un porcentaje pequeño del muestreo, 0.5 y 0.1, respectivamente.

5.3.2. Establecimiento de faena

Se encontró asociación entre el tipo de frigorífico del cual procedían las muestras y caldos positivos, expresando un valor $p=0.001$. 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 19,4%.

5.3.3. Tipo de faena

No se encontró asociación entre el tipo de sacrificio realizado en los animales y caldos positivos ($p=0.5977$). Los animales sacrificados mediante faena convencional presentaron un 21,2% de positividad en caldo, en tanto que los que tuvieron una faena tipo Kosher dieron un 25,9% de muestras positivas.

5.3.4. Tipo de alimentación animal

El sistema de alimentación animal no presentó asociación con la presencia de caldo positivos ($p=0.9470$).

5.3.5. Estacionalidad

La estacionalidad del sacrificio animal no presentó asociación con la positividad en caldos, con un valor $p=0.1197$.

5.3.6. Aplicación de intervenciones antimicrobianas (steam vaccum y/o ácidos orgánicos)

La aplicación de intervenciones antimicrobianas durante el proceso de faena presentó asociación con la cantidad de muestras positivas, con un valor $p=0.0002$. En los establecimientos que declararon la aplicación de algún tipo de intervención el porcentaje de positividad a nivel de caldo fue de 18,0%, en aquellos que no declararon su uso el porcentaje ascendió a 29,7%.

5.3.7. Presencia de pelos en la media canal

Se encontró asociación entre la presencia de pelos visibles en las medias canales muestreadas y caldos positivos ($p=0.0001$). Las medias canales que tenían pelos visibles presentaron un porcentaje de positividad del 31,6% y las que no, un 16,6%.

5.3.8. Análisis multivariado

El análisis multivariado permitió evaluar cuáles de las variables estudiadas incidieron de manera conjunta sobre la prevalencia de genes *stx* en los caldos de enriquecimiento.

Se estableció que, de las variables analizadas, tipo de frigorífico, categoría animal y presencia de pelos tenían un efecto simultáneo en el porcentaje de positividad en caldo (Tabla 20).

Tabla 20. Resultados del análisis multivariado.

Maximun likelihood Analysis of Variance			
Source	DF	Chi-Square	Pr > ChiSq
Época del año	1	1.40	0.2369
Tipo frigorífico	1	18.48	<0.0001
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

En color rojo se destacan las variables que mostraron una asociación significativa ($p < 0,05$) con la presencia de genes *stx*.

5.4 Aislamiento de STEC

Las 179 muestras que dieron señal *stx* positiva en el caldo de enriquecimiento, fueron sembradas en placas según el procedimiento descrito anteriormente. En 23 (12,8%) muestras no se detectó la presencia de genes *stx* en la zona de descarga. La señal en el resto de las muestras se distribuyó según se muestra en la tabla 21 a continuación:

Señal de PCR obtenida en la lisis de la descarga	Cantidad de muestras (%)
<i>stx1</i> pos/ <i>stx2</i> pos	69 (39%)
<i>stx1</i> neg/ <i>stx2</i> pos	65 (36%)
<i>stx1</i> pos/ <i>stx2</i> neg	22 (12%)
<i>stx1</i> neg/ <i>stx2</i> neg	23 (13%)

Tabla 21. Resultados de PCR a tiempo final en la lisis de la descarga en placa de caldos con señal positiva para *stx* por PCR a real time.

A partir de las descargas con señal positiva para *stx1*, *stx2* o ambos ($n=156$) se procedió al estudio de cepas individuales para poder recuperar aquellas que portaban los genes en cuestión.

En 35 de las muestras con descarga positiva, no fue posible obtener colonias aisladas *stx* positivos, reduciéndose así el valor de prevalencia de muestras con STEC a 121 (15,1 %).

En 4 de los 29 establecimientos *stx* positivos no se pudieron obtener aislamientos STEC para caracterizar: en 2 no se recuperaron cepas positivas del caldo y en los otros 2 se perdió la señal *stx* a lo largo de los aislamientos para la caracterización.

Se observó una alta tasa de pérdida de señal de *stx* cuando se descongelaron los aislados para ser caracterizados. De 90 cepas que habían dado *stx* positivo al momento de su aislamiento (*stx1*: 11 cepas, *stx2*: 32, *stx1+stx2*: 47 aislados), 21 dieron negativas luego de descongeladas (23.3%). La mayoría de las cepas que perdieron la señal (76.2%), habían dado *stx1+/stx2+* previo a su congelamiento.

5.5 Detección y aislamiento de *Escherichia coli* O157:H7

Dos de las 800 muestras dieron positivas para *Escherichia coli* O157:H7, arrojando así una prevalencia estimada del 0.25% (IC 95 0%-0.6%). En ambas muestras fue posible recuperar la cepa en medios cromogénicos. Los dos aislados de 2 medias canales del mismo establecimiento, tropa y del mismo día de muestreo, por lo que, para ahorrar recursos, se optó por seguir con una sola de ellas para la caracterización.

Las características de las dos muestras O157:H7 positivas fueron las siguientes:

- Obtenidas en estación **cálida**
- Tipo de alimentación: **pasto**
- Frigorífico de **abasto**
- **Vaquillonas** de 4 dientes
- Con **pelos** visibles en la canal
- Tipo de faena **tradicional**
- El establecimiento fue visitado en una sola ocasión, en la cual se tomaron 5 muestras. Todas dieron positivas para *stx*

5.6 Selección de aislamientos STEC para su caracterización

El grupo de 50 cepas seleccionadas a estudiar, con las características de su lugar de origen y otras variables analizadas, se lista en la tabla 22.

Tabla 22. Detalles de las muestras de las que se obtuvieron los aislados a caracterizar.

ID	Categoría animal	Estación muestreo	Tipo alimentación	Tipo faena	Pelos visibles	Intervención	Código est.	Tipo de establecimiento	Perfil virulencia por tfPCR
H 1	vaquillona	cálida	Pasto	tradicional	si	no	532	abasto	<i>stx2</i>
H 2	vaca	fría	Pasto	tradicional	si	si	149	exportación	<i>stx1/stx2</i>
H 3	novillo	fría	Pasto	tradicional	no	si	257	exportación	<i>stx 2</i>
H 4	vaquillona	cálida	Pasto	tradicional	si	no	532	abasto	<i>stx1/stx2</i>
H 5	novillo	fría	Pasto	tradicional	si	no	428	exportación	<i>stx1/ea</i>
H 6	vaca	fría	pasto	tradicional	no	si	936	exportación	<i>stx1</i>
H 7	vaca	cálida	pasto	tradicional	si	no	428	exportación	<i>stx1/stx2</i>
H 8	novillo	fría	corral	kosher	no	si	257	exportación	<i>stx1</i>
H 9	vaca	cálida	pasto	tradicional	si	no	273	exportación	<i>stx 2</i>
H 10	vaca	fría	pasto	tradicional	no	no	123	exportación	<i>stx 2</i>
H 11	vaca	cálida	pasto	tradicional	si	si	583	exportación	<i>stx1/stx2</i>
H 12	vaquillona	cálida	pasto	tradicional	no	no	673	abasto	<i>stx1/stx2</i>
H 13	vaquillona	cálida	pasto	tradicional	no	si	257	exportación	<i>stx1/stx2</i>
H 14	vaquillona	cálida	pasto	tradicional	si	no determ.	667	abasto	<i>stx1/stx2</i>
H 15	novillo	fría	pasto	tradicional	si	si	273	exportación	<i>stx1/stx2</i>
H 16	vaca	cálida	pasto	tradicional	si	no	930	exportación	<i>stx1/stx2</i>
H 17	vaca	cálida	pasto	kosher	si	no	788	exportación	<i>stx1/stx2</i>
H 18	vaquillona	fría	pasto	tradicional	si	si	497	abasto	<i>stx2</i>
H 19	vaquillona	fría	corral	tradicional	si	si	428	exportación	<i>stx2</i>
H 20	vaquillona	cálida	pasto	tradicional	si	no	532	abasto	<i>stx1/stx2/ea</i>
H 21	vaca	cálida	pasto	tradicional	no	si	995	exportación	<i>stx2</i>
H 22	novillo	fría	pasto	tradicional	si	no	467	exportación	<i>stx1/stx2</i>
H 23	novillo	fría	pasto	tradicional	si	no	107	exportación	<i>stx1/stx2</i>
H 24	vaquillona	cálida	pasto	tradicional	no	no	449	abasto	<i>stx2</i>
H 25	vaquillona	cálida	pasto	tradicional	si	no	485	abasto	<i>stx2</i>
H 26	vaquillona	cálida	pasto	tradicional	si	no	810	abasto	<i>stx1</i>
H 27	vaquillona	cálida	pasto	tradicional	no	si	915	exportación	<i>stx1</i>
H 28	novillo	fría	pasto	tradicional	si	si	491	exportación	<i>stx1/stx2</i>
H 29	novillo	cálida	pasto	kosher	no	si	933	exportación	<i>stx1/stx2</i>
H 30	novillo	fría	pasto	tradicional	si	no	467	exportación	<i>stx 2</i>
H 31	novillo	fría	corral	kosher	no	si	257	exportación	<i>stx1/stx2</i>
H 32	vaquillona	fría	pasto	tradicional	no	si	149	exportación	<i>stx2</i>
H 33	novillo	fría	pasto	tradicional	si	si	428	exportación	<i>stx1/stx2</i>
H 34	novillo	fría	pasto	tradicional	no	no	597	exportación	<i>stx1/stx2</i>

H 35	vaquillona	cálida	pasto	tradicional	si	si	371	exportación	<i>stx2</i>
H 36	vaquillona	fría	pasto	tradicional	no	si	149	exportación	<i>stx1/stx2</i>
ID	Categoría animal	Estación muestreo	Tipo alimentación	Tipo faena	Pelos visibles	Intervención	Código establecimiento	Tipo de establecimiento	Perfil virulencia por tPCR
H 37	vaquillona	cálida	pasto	tradicional	si	no determ.	667	abasto	<i>stx1/stx2</i>
H 38	novillo	cálida	pasto	tradicional	no	no	597	exportación	<i>stx2</i>
H 39	vaca	fría	pasto	tradicional	si	no	467	exportación	<i>stx1</i>
H 40	novillo	cálida	pasto	tradicional	no	no	597	exportación	<i>stx2</i>
H 41	vaca	cálida	pasto	tradicional	si	si	583	exportación	<i>stx2</i>
H 42	novillo	cálida	pasto	tradicional	si	no	985	exportación	<i>stx1</i>
H 43	novillo	cálida	pasto	tradicional	no	si	915	exportación	<i>stx1/stx2</i>
H 44	novillo	cálida	pasto	tradicional	no	no	597	exportación	<i>stx1/stx2</i>
H 45	vaca	fría	pasto	tradicional	si	no	467	exportación	<i>stx2</i>
H 46	novillo	cálida	pasto	tradicional	si	si	149	exportación	<i>stx2</i>
H 47	vaquillona	cálida	pasto	tradicional	no	no	936	exportación	<i>stx2</i>
H 48	vaquillona	cálida	pasto	tradicional	si	no	673	abasto	<i>stx1/stx2</i>
H 49	vaquillona	cálida	pasto	tradicional	si	no	485	abasto	<i>stx1/stx2</i>
H 50	novillo	cálida	pasto	tradicional	no	no	123	exportación	<i>stx1/stx2</i>

5.7 Caracterización fenotípica

5.7.1. Resistencia antimicrobiana por la técnica de Disco difusión

De las 50 cepas analizadas, la H16 fue la única que mostró resistencia. Los halos de inhibición obtenidos para esta cepa evidenciaron una resistencia para trimetoprim-sulfametoxazol y para ampicilina; y una resistencia intermedia para la combinación ampicilina con clavulánico. Los diámetros resultantes para todos los aislados frente a los 14 antimicrobianos ensayados, expresados en mm, pueden verse en la Tabla 23.

	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15	H16	H17	H18	H19	H20	H21	H22	H23	H24	H25
AMC	24	25	23	21	25	26	22	24	22	22	22	26	22	25	23	17	24	24	24	22	24	25	27	24	26
CRO	36	35	30	30	33	35	32	34	35	32	32	37	38	35	31	23	35	34	36	31	36	32	30	35	35
CXM	26	24	21	21	25	25	22	24	24	22	26	24	22	25	21	22	24	26	28	21	26	24	26	22	24
FOT	30	35	30	30	30	36	36	38	33	32	32	32	36	35	34	35	34	36	30	37	32	32	34	31	34
FOX	29	26	28	26	24	30	26	26	30	26	30	30	26	30	25	25	30	30	32	24	30	28	30	29	26
CAZ	30	32	30	28	30	32	32	32	32	28	34	36	26	32	28	29	32	34	32	30	31	30	31	30	30
FEP	30	30	30	30	30	34	34	34	30	31	30	30	32	30	32	30	33	30	30	33	30	30	31	31	30
CN	20	23	20	23	21	20	20	20	24	23	22	23	20	20	20	19	31	22	22	20	22	23	23	20	20
AK	22	25	20	23	20	19	19	18	24	24	25	22	19	22	20	19	20	24	25	20	21	22	23	25	21
CIP	31	36	30	31	31	40	30	30	32	34	33	36	33	38	35	29	32	32	40	38	32	32	31	36	30
IPM	30	32	27	25	30	32	29	30	34	30	29	32	30	28	30	30	30	30	30	28	30	23	30	31	30
STX	31	30	30	30	32	32	28	32	32	30	31	30	30	30	32	6	21	32	28	31	30	30	30	31	24
MEM	32	34	30	30	32	34	34	32	34	30	24	30	32	31	28	28	28	33	36	30	33	30	30	31	32
AMP	21	20	18	20	22	33	18	20	20	22	21	21	19	21	20	6	40	22	21	21	24	20	24	20	20

	H26	H27	H28	H29	H30	H31	H32	H33	H34	H35	H36	H37	H38	H39	H40	H41	H42	H43	H44	H45	H46	H47	H48	H49	H50
AMC	24	27	24	20	23	24	19	19	20	25	19	23	25	26	24	24	24	22	26	25	24	25	22	26	22
CRO	30	33	30	28	28	32	27	29	29	30	30	31	31	32	30	30	32	30	32	31	30	35	28	32	32
CXM	24	25	22	20	25	28	20	21	20	28	22	25	26	24	23	30	28	23	26	24	20	25	20	26	20
FOT	34	32	32	34	31	30	42	30	32	30	32	31	31	30	34	30	36	36	32	38	34	33	34	34	38
FOX	28	27	25	24	31	28	24	24	26	30	26	30	31	30	24	30	28	26	29	24	26	27	26	29	25
CAZ	30	31	28	27	25	30	25	29	27	30	31	30	31	30	30	30	39	29	32	30	30	34	27	32	28
FEP	30	31	25	33	31	30	28	32	31	30	32	31	30	30	32	30	34	32	31	32	32	32	33	32	31
CN	20	22	20	19	26	20	20	18	17	28	18	20	22	19	18	20	20	21	21	19	20	22	18	22	19
AK	20	23	19	19	20	20	20	18	18	22	18	20	20	20	17	20	21	21	22	19	19	23	20	21	20
CIP	40	32	30	30	31	31	30	30	29	31	29	31	31	30	30	31	36	36	32	29	31	34	30	32	32
IPM	30	30	30	30	25	31	30	28	27	31	30	26	26	29	26	31	28	28	30	29	29	30	28	29	30
STX	32	30	28	28	30	32	30	28	29	31	30	30	30	23	27	28	32	32	30	28	30	32	29	32	33
MEM	32	33	30	30	30	31	32	30	27	31	30	27	31	32	30	31	30	30	31	30	28	33	28	33	30
AMP	22	22	20	20	20	23	18	17	17	22	20	20	30	22	22	20	22	22	22	20	19	24	20	21	20

Tabla 23. Diámetros de zona de inhibición en mm de las 50 cepas frente a los antimicrobianos testeados. En rojo se muestran los valores que evidencian un resultado de resistencia, y en amarillo, resistencia intermedia.

Dentro de las pruebas que mostraron una mayor variabilidad con respecto al resultado esperado para *Escherichia coli*, se destacan la fermentación de la rafinosa con un 74% de positivas, la prueba de indol negativa en un 48% (resultado que llama la atención por la prueba realizada en el tamizaje inicial a la hora de seleccionar las colonias), la descarboxilación de la arginina con un 40% de positivas, la incapacidad de reducir el nitrato a nitrito en un 46% y la imposibilidad de utilizar sacarosa en un 24%. La distribución de estos resultados se observa en la tabla 25 a continuación.

Muestra	ID	ACE	ADO	ARA	ARG	CET	CIT	C6B	CI4	ESC	F664	GLU	H2S	INO	Indol	K4	LYS	MAL	MEL	NIT	OF/G	ONPG	ORN	Oxid	P4	RAF	RHA	SOR	SUC	TAR	TDA	To4	URE	VP	
H1	Escherichia coli																																	2	
H2	Escherichia coli																																		2
H3	Escherichia coli																																		4
H4	Escherichia coli																																		4
H5	Escherichia coli																																		2
H6	Escherichia coli																																		4
H7	Escherichia coli																																		5
H8	Escherichia coli																																		4
H9	Escherichia coli																																		0
H10	Escherichia coli																																		1
H11	Escherichia coli																																		1
H12	Escherichia coli																																		2
H13	Escherichia coli																																		4
H14	Escherichia coli																																		4
H15	Escherichia coli																																		4
H16	Escherichia coli																																		4
H17	Escherichia coli																																		5
H18	Escherichia coli																																		3
H19	Escherichia coli																																		1
H20	Escherichia coli																																		1
H21	Escherichia coli																																		4
H22	Escherichia coli																																		1
H23	Escherichia coli																																		1
H24	Escherichia coli																																		1
H25	Escherichia coli																																		1
H26	Escherichia coli																																		1
H27	Escherichia coli																																		2
H28	Escherichia coli																																		2
H29	Escherichia coli																																		6
H30	Escherichia coli																																		4
H31	Escherichia coli																																		4
H32	Escherichia coli																																		2
H33	Escherichia coli																																		3
H34	Escherichia coli																																		4
H35	Escherichia coli																																		4
H36	Escherichia coli																																		4
H37	Escherichia coli																																		1
H38	Escherichia coli																																		1
H39	Escherichia coli																																		1
H40	Escherichia coli																																		4
H41	Escherichia coli																																		1
H42	Escherichia coli																																		4
H43	Escherichia coli																																		5
H44	Escherichia coli																																		1
H45	Escherichia coli																																		5
H46	Escherichia coli																																		1
H47	Escherichia coli																																		1
H48	Escherichia coli																																		4
H49	Escherichia coli																																		1
H50	Escherichia coli																																		4

Tabla 25. Concordancia con resultados de pruebas bioquímicas esperados para E. coli. En verde si coincide con lo esperado, en rojo si muestra un diferente al reportado por la referencia [113].

En la tabla 26 se detallan aquellos aislados que mostraron 5 o más resultados no concordantes con el perfil bioquímico esperado para *Escherichia coli*.

Muestra	Pruebas en contra	Serotipo ¹	ST ²	Virulotipo ³
H7	Indol, LYS, NIT, ONPG, SUC	O116:H48	8583	<i>terC, gad</i>
H28	ARG, Indol, NIT, ONPG, ORN, SUC	O3:H44	216	<i>terC, gad</i>
H43	ARG, Indol, NIT, ONPG, SUC	O81:H7	2313	<i>terC, gad, lpfA, ompT, iss</i>
H45	ARG, Indol, NIT, RAF, SUC	O178:H19	192	<i>stx2c, lpfa, iha, ompT, hra, hes, iss, traT, espP, terC, gad</i>

Tabla 26. Aislados con 5 o más pruebas bioquímicas con resultados no esperados. Referencias: 1. Determinado con Serotype Finder 2.0; 2. Determinado con MLST Finder 2.0 (E. coli #1); 3. Determinado con Virulence Finder 2.0.

5.7.2.2. Resistencia antimicrobiana según resultados de MicroScan

Los resultados de las Concentraciones Inhibitorias Mínimas - CIM en mg/L determinadas con el “Neg Combo Panel Type 66” del MicroScan para los 50 aislados se muestran en la tabla 27. La interpretación de los valores de corte clínicos fue realizada según las pautas CLSI, para la cefalotina fue necesario realizarlo con la edición 25, ya que fue removida en ediciones posteriores [177]. En verde se indican valores de sensibilidad, en amarillo valores de resistencia intermedia y, en rojo aquellos antibióticos a los cuáles se determinó resistencia.

5.7.3. Serotipificación por aglutinación clásica

En el laboratorio de Salud Pública de la Universidad Autónoma de México se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 28. Resultados de serotipificación por aglutinación con sueros policlonales realizada en la Universidad Autónoma de México.

ID H	Serotipo	ID H	Serotipo	ID H	Serotipo
1	O130:H11	18	O174:H28	35	O105ab:H4
2	O113:H21	19	O120:H7	36	O188:H2
3	O22:H8	20	O157:H7	37	O130:H11
4	O22:H8	21	O87:H2	38	O6:H34
5	no analizada	22	O-:H21	39	O10:H42
6	no analizada	23	O130:H11	40	O121:H14
7	O?:H51/O171:H2	24	O185:H7	41	O22:H8
8	O156:H10	25	O185:H7	42	O8:H16
9	O174:H21	26	O174:H28	43	O?:H7
10	O174:H21	27	O156:H10	44	O22:H8
11	O130:H11	28	O3:H55	45	O178:H19
12	O149:H2	29	no analizada	46	O39:H-
13	O74:H42	30	O22:H8	47	O171:H2
14	O130:H11	31	O159:H28	48	O8:H19
15	O8:H19	32	O?:H7	49	O130:H11
16	O7:H4	33	no analizada	50	O174:H28
17	O178:H19	34	O8:H16		

5.8 Caracterización genómica

Los parámetros de calidad de las lecturas crudas obtenidas de Macroverificadas con FastQC se muestran en la tabla 29.

ID muestra	Secuencias totales	Longitud de la secuencia	Calidad de la secuencia base	Contenido de secuencia base	GC de secuencia base (%)	Contenido de base N	Niveles de duplicación de secuencias
H1	11473053	151			51		
H2	10597534	151			51		
H3	11149299	151			51		
H4	11657635	151			51		
H5	11298846	151			50		
H6	8240104	151			51		
H7	R1: 9858492/R2: 9403839	R1: 151/R2: 20-151			51		
H8	11194235	151			51		
H9	10982191	151			51		
H10	11724512	151			51		
H11	11846676	151			51		
H12	10805844	151			51		
H13	7228510	151			51		
H14	11617292	151			51		
H15	11452491	151			51		
H16	7669105	151			R1: 50/R2: 51		
H17	11556490	151			51		
H18	11528840	151			51		
H19	10864040	151			51		
H20	9921373	151			R1: 50/R2: 51		
H21	11330179	151			51		
H22	11243153	151			51		
H23	10617867	151			51		
H24	10919504	151			51		
H25	11268144	151			51		
H26	7142375	151			51		
H27	11239974	151			51		
H28	9157192	151			51		
H29	11196743	151			R1: 50/R2: 51		
H30	10943264	151			51		
H31	11008443	151			51		
H32	6880484	151			51		
H33	8689986	151			51		
H34	11411858	151			R1: 50/R2: 51		
H35	11002785	151			51		
H36	11434949	151			51		
H37	11679440	151			51		
H38	7288837	151			51		
H39	7328330	151			51		
H40	8087328	151			50		
H41	6737324	151			51		
H42	11793161	151			50		
H43	6947850	151			51		
H44	6841553	151			51		
H45	11211123	151			51		
H46	8015788	151			51		
H47	6729324	151			51		
H48	8702125	151			51		
H49	7172673	151			51		
H50	8174682	151			51		

Tabla 29. Marcadores de calidad de FastQC de las lecturas crudas de los 50 aislamientos. En verde se marcan los parámetros para los que se obtuvieron buenos resultados. En los casos que no se especifica lo contrario, se obtuvieron datos equivalentes para R1 y R2 de cada muestra [178].

5.8.1. Ensamblado de contigs

Los parámetros de calidad de los ensamblados realizados con el programa Velvet se muestran en la tabla 30:

	Nodos	n50	Máx	total	Lecturas usadas	Lecturas totales
H1	1139	171960	452337	5118443	21642094	21976478
H2	1564	140039	398169	5236315	19852547	20230724
H3	902	157067	437850	5022547	21004976	21280734
H4	820	135005	607751	5097432	21954058	22256134
H5	1361	93837	318657	5065840	21329859	21730998
H6	843	164838	446110	5088391	15405372	15612348
H7	1058	66241	223712	4684056	18460598	18807678
H8	884	131522	583585	5024756	21121441	21394894
H9	879	131401	603987	5029212	20652314	20928060
H10	669	134666	348994	4923430	22161722	22442674
H11	988	216988	325339	4994559	22307538	22636184
H12	921	134489	650015	5063581	20491377	20785610
H13	749	143190	608611	5023556	13378599	13562962
H14	1066	156286	479925	5032094	21910862	22281222
H15	722	185076	384466	4849973	21964860	22171712
H16	994	111166	381341	4808299	14327805	14565070
H17	881	157773	353810	5183098	21873296	22150234
H18	1086	161035	513890	5019318	21604147	21953936
H19	710	161152	338889	4854803	20541327	20841772
H20	2078	124698	374520	5376529	17866889	18636864
H21	748	132968	401557	4845010	21260673	21630406
H22	837	161491	620072	5056120	21193575	21522810
H23	1203	156285	295780	5069844	19838282	20195148
H24	807	125219	493179	4981739	20529908	20815840
H25	1075	88747	493202	5012343	21074879	21442070
H26	1048	167049	481836	5150483	13284160	13467708
H27	1038	118774	349393	5382439	21042899	21410416
H28	837	91775	261877	4573249	17076382	17303808
H29	664	154334	459366	4991758	21662434	21566130
H30	934	130298	490217	5003828	20523859	20842364
H31	4439	9584	174880	5556971	20515409	21057550
H32	1084	146754	576966	5196466	12660180	12852940
H33	639	130179	638760	4734150	16085136	16401928
H34	614	231615	614371	4985930	21657678	21888928
H35	6551	5628	74728	5337897	20309264	20955918
H36	742	155151	600525	4996826	21426301	21949182
H37	889	193925	483123	5010611	21984686	22308572
H38	617	243077	792224	4897963	13689798	13835824
H39	9579	2929	40204	6332999	13461739	13800240
H40	747	232458	536139	5027821	15291158	15476128
H41	678	166480	626107	4947680	12546551	12702380
H42	522	532719	109599	4960980	22377624	22611102
H43	750	197542	557303	4860804	13037224	13252360
H44	859	118506	458543	5145962	12655325	12832958
H45	771	135207	777483	5105642	21460416	21662138
H46	847	146297	710986	4994617	14894310	15105498
H47	1033	136694	350948	5299356	12461398	12635090
H48	738	182139	438842	4879285	16236234	16442674
H49	833	194200	578768	4960807	13280101	13534322
H50	1007	184173	697942	5032152	15322815	15518650

Tabla 30. Marcadores de calidad obtenidos al correr el programa Velvet para el ensamblaje de los contigs de las secuencias de los 50 aislados. En rojo se señalan aquellas muestras que dieron parámetros de calidad del ensamblado bajos (gran número de contigs de menor longitud).

5.8.2. Búsqueda de genes de virulencia, resistencia antimicrobiana y serotipificación molecular

5.8.2.1. Uso del Center for Genomic Epidemiology - CGE y Clermont Typer

En la tabla 31 se muestran los genes de virulencia detectados y serotipo identificado al cargar los contigs de los distintos aislamientos en el Virulence Finder y el Serotype Finder del CGE, respectivamente. Se especifican también los subtipos de *stx* identificados para *stx1* y *stx2*.

En la tabla 32 se listan los secuenciotipos determinados en el CGE, tanto de cgMLST como de MLST, y el filogrupo de Clermont. Para poder interpretar mejor los datos también se especifican los serogrupos de las muestras, así como el código del establecimiento del cuál proviene y fecha de muestreo.

ID H	Serotipo	cgMLST	MLST E.coli#1	Clermont Typing	Establecimiento	Fecha
20	O157:H7	143316	11(b)	E	532	6-2-19
28	O3:H44	99786	21(c)	A	491	17-6-19
16	O7:H4	97006	93(a)	A	930	12-11-18
18	O174:H28	30713	156	B1	497	18-6-19
26	O174:H28	30713	156	B1	810	27-11-18
50	O174:H28	30713	156	B1	123	18-2-20
45	O178:H19	55495	192	B1	467	30-7-19
1	O130:H11	14680	297	B1	532	6-2-19
11	O130:H11	14680	297	B1	583	11-12-18
12	O149:H2	56563	297	B1	673	19-2-19
14	O130:H11	14680	297	B1	667	20-3-19
23	O130:H11	14680	297	B1	107	3-4-19
37	O130:H11	14680	297	B1	667	20-3-19
49	O130:H11	14680	297	B1	485	8-1-19
5	O182:H25	23328	300	B1	428	1-7-20
47	O171:H2	29334	332	B1	936	6-2-20
27	O156:H10 (*)	33555	441	B1	915	15-11-18
17	O178:H19	90162	443	B1	788	9-1-19
3	O22:H8	61220	446	B1	257	28-8-19
4	O22:H8	3550	446	B1	532	6-2-19
30	O22:H8	61220	446	B1	467	3-7-19
41	O22:H8	61220	446	B1	583	11-12-18
44	O22:H8	3550	446(d)	B1	597	5-11-19
9	O174:H21	30874	677	B1	273	22-1-19
10	O174:H21	30874	677	B1	123	24-9-19
33	O147:H21	104674	1123	B1	428	17-9-18
13	O74:H42	109431	1172	B1	257	15-1-20
22	O-:H21	8525	1248	B1	467	3-7-19
6	O88:H25	30013	1679	B1	936	11-6-20
19	O120:H7 (*)	14780	1727	B1	428	14-8-19
43	O81:H7	10215	2313	B1	915	15-11-18
24	O185:H7	100335	2387	B1	449	12-12-18
25	O185:H7	100335	2387(c)	B1	485	8-1-19
46	O116:H49	129738	2520	B1	149	21-1-20
29	O153:H8	75035	2522(d)	B1	933	9-10-18
34	O8:H16	27387	2602	B1	597	26-5-20
42	O8:H16	27387	2602	B1	985	20-1-20
2	O113:H21	64062	3695	B1	149	17-9-19
36	O188:H2 (*)	104336	5973	B1	149	5-9-18
8	O156:H10 (*)	1049	6190	B1	257	20-8-18
15	O8:H19	120895	6661	B1	273	27-5-20
48	O8:H19	120895	6661(b)	B1	673	19-2-19
38	O6:H34	50676	7616	B1	597	5-11-19
7	O116:H48	75216	8583	A	428	12-3-19
40	O121:H14	5937	11594	B1	597	10-10-19
21	O87:H2	26095	No definido	B1	995	5-2-19
31	O130:H11	141562	No definido	B1	257	20-8-18
32	O20:H7	73647	No definido	B1	149	17-9-19
35	O105:H4/8	40075	No definido	B1	371	21-1-19
39	O10:H42 (*)	52675	No definido	B1 (**)	467	30-7-19

Tabla 32. Secuenciotipos obtenidos a partir del CGE y filogrupos por el Clermont Typer. (*) Resultados asignados por aglutinación; (**) No se puede establecer con certeza. Quizás por una mutación que afecta la unión de uno de los primers; (a) Nuevo alelo en el locus *adk*, se indica el ST más cercano; (b) Nuevo alelo en el locus *gyrB*, se indica el ST más cercano; (c) Nuevo alelo en el locus *mdh*, se indica el ST más cercano; (d) Nuevo alelo en el locus *icd*, se indica el ST más cercano.

Según el ResFinder sólo 3 de las 50 cepas estudiadas contienen genes de resistencia (Tabla 33).

Antimicrobiano	Clase	Cepa/Background genético		
		H16*	H19	H39
Estreptomicina	aminoglucósidos	<i>aph(3'')-Ib</i> (AF321551), <i>aph(6)-Id</i> (CP000971)		<i>aph(3'')-Ib</i> (AF024602, AF313472, AF321551, AF321550), <i>aph(6)-Id</i> (M28829)
amoxicilina	beta-lactámico	<i>blaTEM-1B</i> (AY458016)		
ampicilina				
cefalotina				
piperacilina				
ticarcilina				
sulfametoxazol	antagonista de la vía del folato	<i>sul2</i> (AY034138)		<i>sul2</i> (AY034138)
trimetoprima		<i>dfrA8</i> (U10186)		
Fosfomicina	fosfomicina		<i>fosA7</i> (LAPJ01000014)	
peróxido de hidrógeno	peróxido	<i>sitABCD</i> (AY598030)		
doxiciclina	tetraciclina	<i>tet(B)</i> (AF326777)		<i>tet(B)</i> (AP000342)
minociclina				
tetraciclina				

Tabla 33. Resultados de la detección de genes asociados con AMR a partir de ResFinder4.1. Entre paréntesis se muestra el número de acceso a la secuencia del gen en el NCBI. (*) No se confirmó como STEC por WGS.

5.8.2.2. Determinación de subtipos de *stx* y búsqueda de otros genes vinculados a virulencia por PCR *in silico*

A continuación, en la Tabla 34, se muestran los resultados obtenidos por PCR *in silico* para varios genes adicionales de virulencia, así como la subtipificación de *stx* de modo de confirmar o definir el subtipo en aquellos resultados inconclusos obtenidos por el CGE.

Muestra H	Subtipo stx		hes	aggR	aaiC	saa	sab	ompA	ureC	efa1
	stx1	stx2								
1	-	stx2a	p	n	n	p	n	p	n	n
2	stx1a	stx2d	n	n	n	n	n	p	n	n
3	-	stx2c	n	n	n	n	n	p	n	n
4	-	stx2c	p	n	n	n	n	p	n	n
5	stx1a	-	n	n	n	n	n	p	n	n
6	stx1d	-	n	n	n	n	n	p	n	n
7	-	-	n	n	n	n	n	p	p	n
8	stx1d	-	n	n	n	n	n	p	n	n
9	-	stx2d	p	n	n	n	n	p	n	n
10	-	stx2d	p	n	n	n	n	p	n	n
11	stx1a	stx2a	n	n	n	p	p	p	n	n
12	-	-	n	n	n	n	n	p	n	n
13	stx1a	stx2c	p	n	n	p	n	p	n	n
14	stx1a	stx2a	n	n	n	p	p	p	n	n
15	stx1a	stx2a	n	n	n	p	n	p	n	n
16	-	-	n	n	n	n	n	p	n	n
17	stx1a	stx2a	p	n	n	p	p	p	n	n
18	-	stx2a	p	n	n	p	n	p	n	n
19	-	stx2c	p	n	n	n	n	p	n	n
20	stx1a	stx2c	n	n	n	n	n	p	n	p
21	-	-	n	n	n	n	n	p	n	n
22	stx1a	stx2a	n	n	n	p	n	p	n	n
23	stx1a	stx2a	n	n	n	p	n	p	n	n
24	-	stx2c	p	n	n	n	n	p	n	n
25	-	stx2c	p	n	n	n	n	p	n	n
26	stx1a	stx2a	p	n	n	p	p	p	n	n
27	stx1d	-	n	n	n	n	n	p	n	n
28	-	-	n	n	n	n	n	p	n	n
29	-	-	n	n	n	n	n	p	n	n
30	-	stx2d	n	n	n	n	n	p	n	n
31	stx1a	stx2a	n	n	n	p	p	p	n	n
32	-	stx2c	p	n	n	n	n	p	n	n
33	-	-	n	n	n	n	n	p	n	n
34	stx1a	stx2a	p	n	n	p	n	p	n	n
35	-	-	n	n	n	n	n	p	n	n
36	-	-	n	n	n	n	n	p	n	n
37	stx1a	stx2d	n	n	n	p	p	p	n	n
38	-	stx2c	n	n	n	n	n	p	n	n
39	stx1d	-	n	n	n	n	n	p	n	n
40	-	-	n	n	n	n	n	p	n	n
41	-	stx2d	n	n	n	n	n	p	n	n
42	stx1a	-	n	n	n	p	n	p	n	n
43	-	-	n	n	n	n	n	p	n	n
44	-	stx2a	p	n	n	n	n	p	n	n
45	-	stx2c	p	n	n	n	n	p	n	n
46	-	stx2a	p	n	n	p	n	p	n	n
47	-	stx2b	p	n	n	n	n	p	n	n
48	stx1a	stx2a	n	n	n	p	n	p	n	n
49	stx1a	stx2d	n	n	n	p	p	p	n	n
50	stx1a	stx2a	p	n	n	p	p	p	n	n

Tabla 34. Resultados obtenidos por PCR *in silico* utilizando IPCress con los cebadores descritos en la tabla 12.

De las 50 cepas seleccionadas para su caracterización, se constató por WGS la pérdida de los genes *stx* en 11 de ellas (O149:H2, O7:H4, O87:H2, O3:H55, O153:H8, O147:H21, O105:H4, O188:H2, O121:H14, O81:H7, O116:H48). La mayoría de las cepas que resultaron *stx* negativas luego del secuenciado, habían sido identificadas como *stx1+*/*stx2+* inicialmente (n=8, 72.7%), mientras que las restantes habían dado señal positiva únicamente para *stx2* (n=3, 27.3%). Ninguna de las 50 cepas analizadas mostró señal positiva para los genes *aggR*, ni *aaIC*, ni *lt*, ni *st*, por lo tanto, en este grupo no se identificaron cepas híbridas EAEC-STEC ni ETEC-STEC. El 36% de las cepas resultaron positivas para los genes *hes* y *saa*, y el gen *sab* estaba presente en 16% de los aislados analizados. Todas las cepas portaban el gen *ompA*, solo una cepa fue positiva para *ureC* (cepa *stx-*) y solo la O157:H7 (H20) dio positiva para *efa1* (Tabla 34).

5.8.3. Identificación de profagos y plásmidos

Se detectaron 383 regiones de profagos con homología a 84 diferentes fagos. El análisis bioinformático realizado por PHASTER identificó 144 profagos intactos, 40 cuestionables y 199 incompletos. Cuarenta y siete cepas presentaron al menos una secuencia de profago completa. Las cepas H7, H16 y H17 no contenían profagos intactos (Tabla 35).

Las regiones de profagos más frecuentemente encontradas fueron *Enterobacteria* phage DE3 (n=23), *Enterobacteria* phage BP_4795 (n=20), *Enterobacteria* phage mEp460 (n=23) y *Escherichia* phage 500465_1 (n=26) (Tabla 35).

En los aislados H2, 3, 7, 28, 29, 30, 36, 38, 41 y 43 no se encontraron secuencias plasmídicas. En el 95% de las cepas positivas, se detectaron secuencias pertenecientes a los grupos de incompatibilidad IncFIB (Tabla 36).

Código H	Col156	IncB/O/K/Z	IncFIB	IncFIB(H89- PhagePlasmid)	IncFII(pHN7 A8)	IncFII	IncX1	IncFIC(FII)	IncFIA	IncY	IncFII(pCoo)	IncFII(29)	pEC4115	Inc(Gamma)	IncX4
1															
4															
5															
6															
8															
9															
10															
11															
12															
13															
14															
15															
16															
17															
18															
19															
20															
21															
22															
23															
24															
25															
26															
27															
31															
32															
33															
34															
35															
37															
39															
40															
42															
44															
45															
46															
47															
48															
49															
50															

Tabla 36. Secuencias plasmídicas detectadas en los aislados de estudio. En verde oscuro se indican aquellos plásmidos con 100% de homología, en verde claro cuando es menor del 100% pero la longitud del fragmento detectado coincide con la longitud del plásmido de referencia, y en gris cuando la identidad es igual al 100% pero la longitud hallada es menor que la plasmídica.

5.8.4. Uso de Aries

Del uso de la plataforma Galaxy-Aries con las lecturas crudas como *input* se obtuvieron varios datos. Dentro de estos, la Tabla 37 muestra los factores de virulencia detectados, el secuenciotipo por MLST, el serogrupo y el "Avg Scaffold coverage". Este valor de cobertura describe el número promedio de lecturas que se alinean o "cubren" bases de referencia conocidas y a menudo determina si el descubrimiento de variantes se puede realizar con un cierto grado de confianza. Se considera para este tipo de estudios con *E. coli* (predicción de serotipos, virulencia y resistencia) con una cobertura de 40x sería suficiente [179]. Salvo dos muestras que no pudieron ser analizadas por Aries, H28 y H35, todas superan este valor.

Para la búsqueda de factores de virulencia Aries utiliza la herramienta "Pathotyper" desarrollada por el proyecto INNUENDO [180] que compara con la base de datos del CGE. A continuación se listan 68 genes de la base de datos que no se encontraron en ninguna de las cepas buscadas:

- *aafa* • *agg3b* • *aggb* • *cfac* • *espf* • *iron* • *pic* • *stb*
- *aafb* • *agg3c* • *aggc* • *cif* • *fana* • *k88ab* • *rpea* • *tccp*
- *aafc* • *agg3d* • *aggd* • *cma* • *fasa* • *lnga* • *saa* • *tsh*
- *aafd* • *agg4a* • *aggr* • *cnf1* • *fedf* • *ltca* • *sat* • *vat*
- *aaic* • *agg4b* • *air* • *cofa* • *fedf* • *nfae* • *senb* • *virf*
- *aap* • *agg4c* • *bfpa* • *eata* • *fim41a* • *orf3* • *sepa*
- *aar* • *agg4d* • *capu* • *efa1* • *hlye* • *orf4* • *sfas*
- *aata* • *agg5a* • *cba* • *eila* • *ipad* • *pera* • *sigf*
- *agg3a* • *agga* • *cci* • *espc* • *ipah9* • *pet* • *sta1*

En la tabla 38, se observan los resultados de búsqueda de genes de resistencia extraídos del ARIES que utiliza el AMRFinderPlus del NCBI. Como se ve en la tabla, la mayor parte de los aislados (92%) contienen genes asociados a β -lactamasas de espectro extendido de clase C: *blaEC-15* y *blaEC-18*. En la cepa H16, identificada por WGS como O7:H4 *stx*-, se encontraron genes que conferirían resistencia a tetraciclina, β -lactámicos, estreptomycin, sulfonamidas y trimetoprima-sulfametoxazol.

Genes AMR	Aislados	
	N	ID
<i>blaEC-18</i>	43	H1-6, H8-15, H17-H18, H21-27, H29-30, H32-38, H40-50
<i>blaEC-15</i>	3	H7, H20, H28
<i>fosA7; blaEC-18</i>	1	H19
<i>tet(B); blaEC-15; aph(3'')-Ib; aph(6)-Id; sul2; dfrA8; blaTEM-1;</i>	1	H16
<i>sul2; tet(B); aph(3'')-Ib; aph(6)-Id;</i>	1	H39
ND	1	H31

Tabla 38. Detección de genes de resistencia antimicrobiana en Aries. N: Número de muestras, ND: No detectados.

5.8.4.1. Asociación filogenética por cgMLST

En la figura 23, se muestra el árbol generado a partir del perfil alélico de cgMLST utilizando chewBBACA y chewTREE de los 50 aislados. Cada círculo corresponde a una muestra y el color representa el secuenciotipo (cgMLST). Las líneas que conectan los círculos muestran los números de diferentes alelos entre dos secuenciotipos.

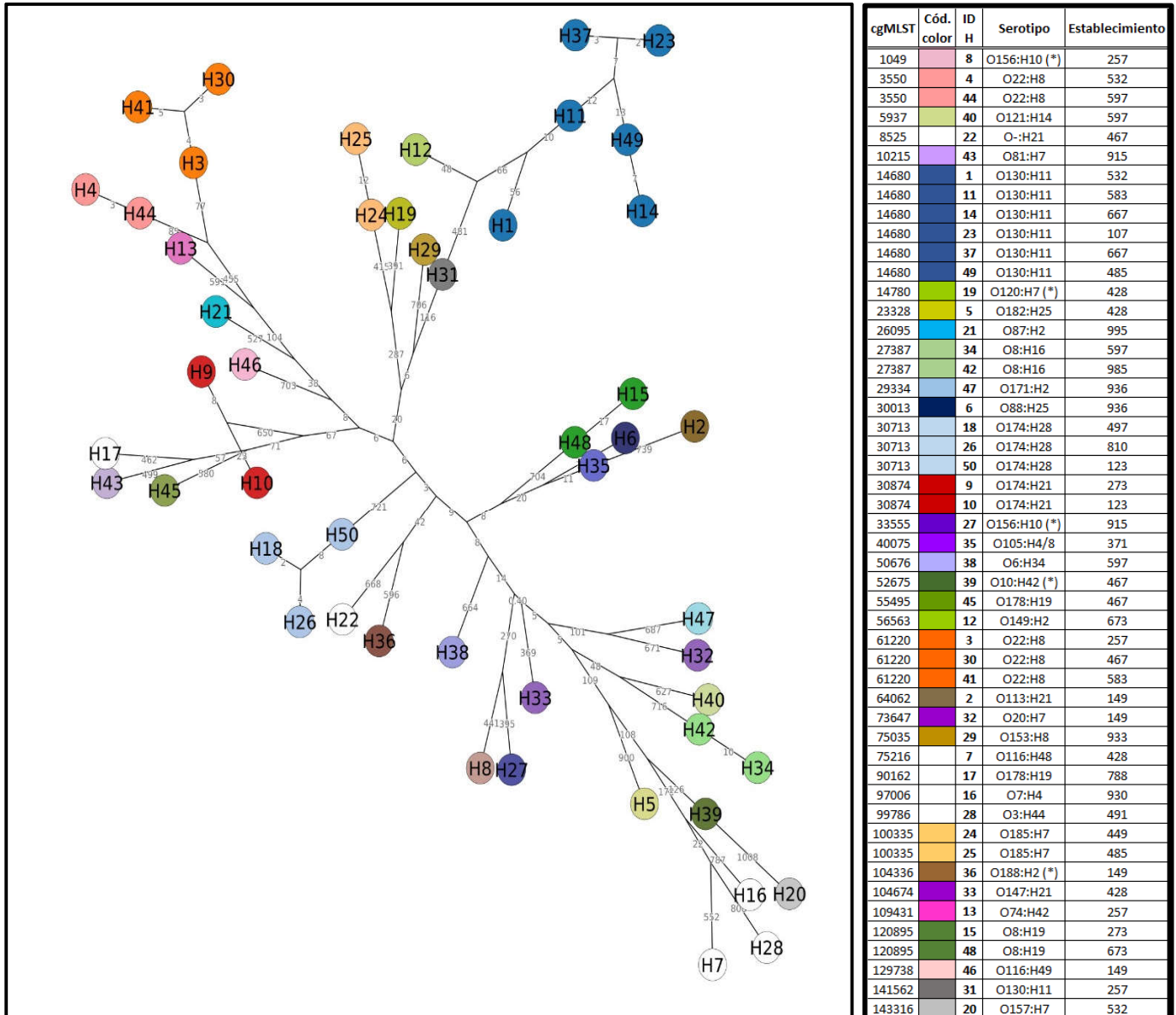


Figura 23. Árbol generado a partir del perfil alélico de cgMLST utilizando chewBBACA y chewTREE de los 50 aislados.

5.8.5. Análisis del pangenoma

El análisis con Roary reconoció un pangenoma de 18604 genes, con un genoma core de 2980 genes; 1984 compartidos por $\geq 99\%$ de los genomas, el "hard core", y 996 genes correspondientes al "soft core" (comunes a $\geq 95\%$ y $< 99\%$). 15624 genes fueron clasificados como accesorios, 2548 genes "shell" y 13076 genes de la "nube" (Figura 24).

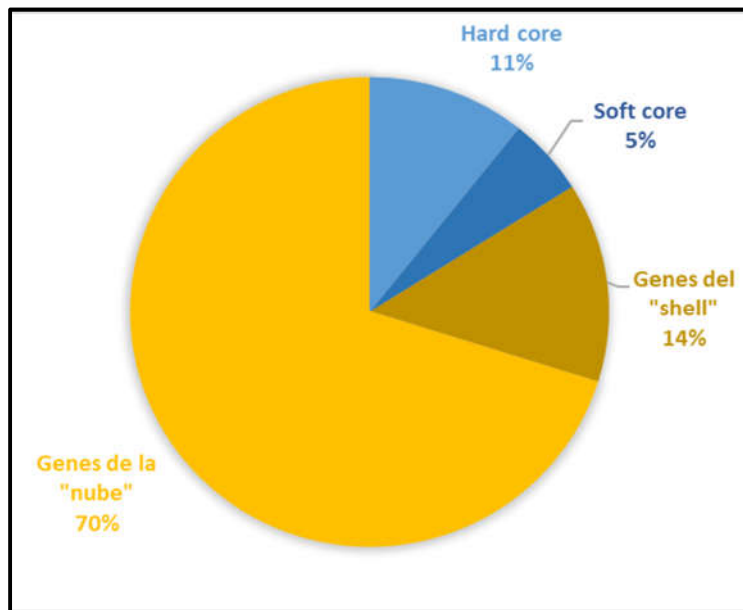


Figura 24. Distribución del pangenoma.

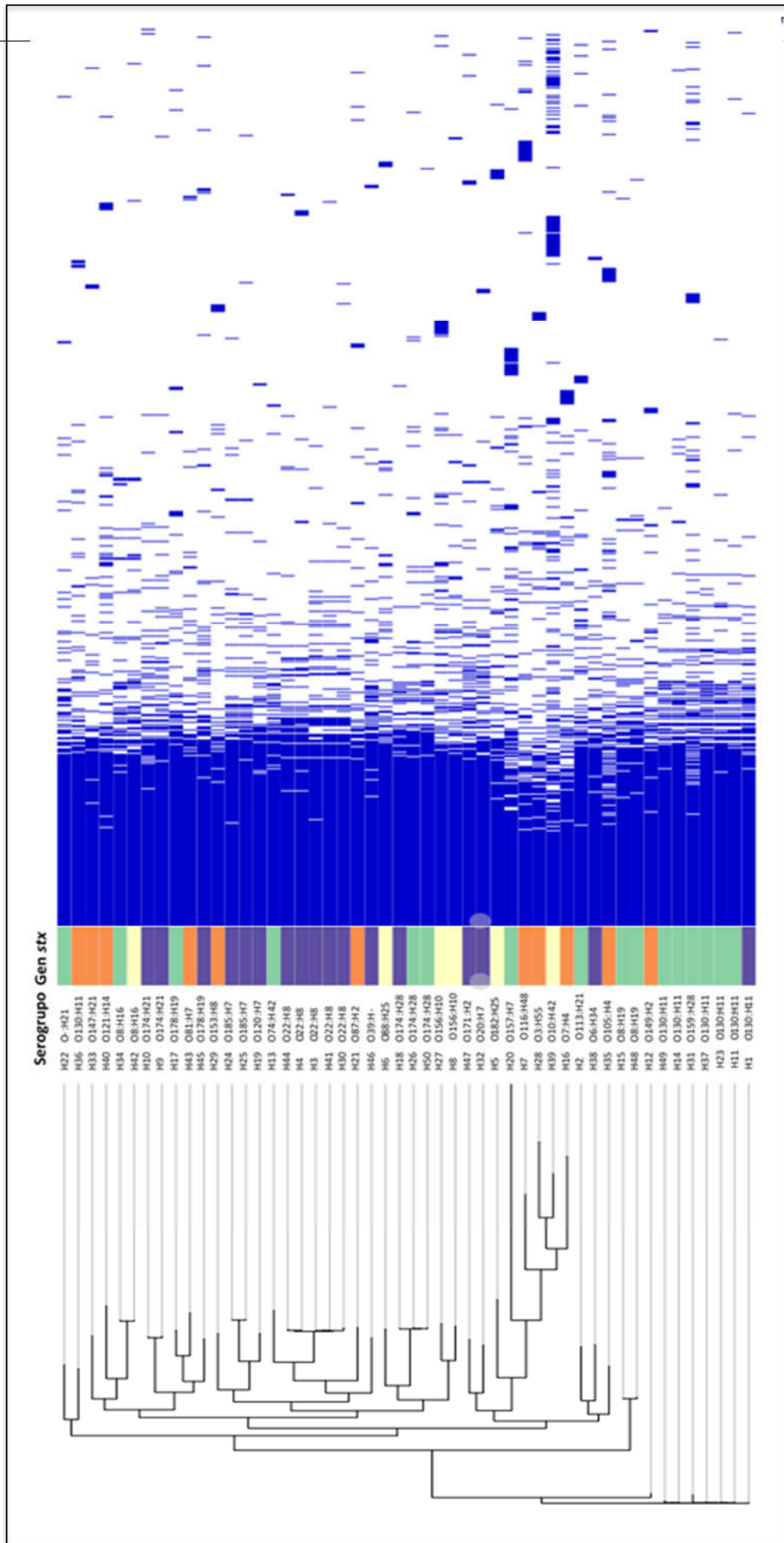


Figura 25. Árbol filogenético basado en la detección de polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) en genes ortólogos de las 50 cepas analizadas. Se muestran los serogrupos y el gen *stx* de cada aislado

5.9 Categorización riesgo FAO/WHO

La distribución de las cepas no-O157 en los grupos de riesgo indicados por FAO/OMS que se muestra a continuación, se realizó tomando los serotipos obtenidos del CGE y por aglutinación con sueros. Los casos en los que el resultado fue discordante entre los dos métodos se marcan en la tabla 39. Los subtipos de *stx* de la categorización fueron los determinados por PCR *in silico*.

Muestra ID	Serotipo	Nivel de Riesgo	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	Muestra ID	Serotipo	Nivel de Riesgo	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>
2	O113:H21	2	a	d	19	O120:H7	5		c
9	O174:H21	2		d	22	O-:H21	5	a	a
10	O174:H21	2		d	23	O130:H11	5	a	a
30	O22:H8	2		d	24	O185:H7	5		c
37	O130:H11	2	a	d	25	O185:H7	5		c
41	O22:H8	2		d	26	O174:H28	5	a	a
49	O130:H11	2	a	d	27	O156:H10 ^(b)	5	d	
5	O182 H25 ^(a)	4	a		31	O130:H11 ^(c)	5	a	a
1	O130:H11	5		a	32	O20 H7 ^(a)	5		c
3	O22:H8	5		b	34	O8 H16	5	a	a
4	O22:H8	5		c	38	O6:H34	5		c
6	O88 H25 ^(a)	5	d		39	O99:H19 ^(d)	5	d	
8	O156:H10 ^(b)	5	d		42	O8 H16	5	a	
11	O130:H11	5	a	a	44	O22:H8	5		c
13	O74:H42	5	a	c	45	O178 H19	5		c
14	O130:H11	5	a	a	46	O39:H-	5		a
15	O8:H19	5	a	a	47	O171:H2	5		b
17	O178:H19	5	a	a	48	O8:H19	5	a	a
18	O174:H28	5		a	50	O174:H28	5	a	a

Tabla 39. Serotipos, niveles de riesgo y subtipos de genes *stx* de las cepas de STEC aisladas de canales bovinas. En azul se resalta el aislado *eae* positivo. (a): Solo por serotipificación molecular; (b): No fue posible serotipar por molecular; (c): No coincide con el serotipado por aglutinación que dio O159:H28; (d): No coincide con el serotipado por aglutinación que dio O10:H42.

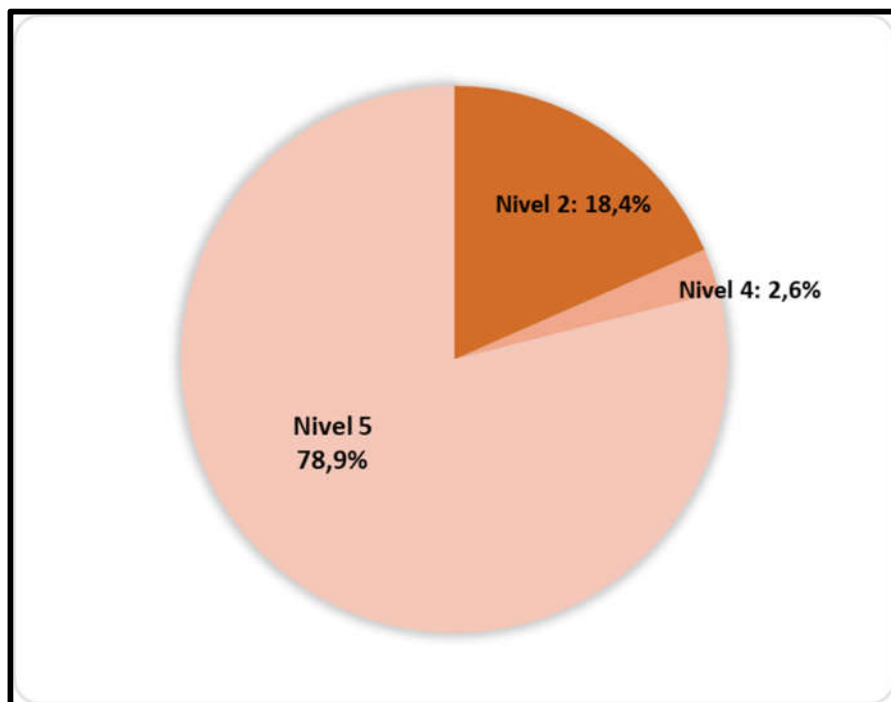


Figura 26. Distribución de los aislados no-O157 en los niveles de riesgo definidos por FAO/OMS [79].
(A menor nivel, mayor riesgo para la salud humana).

6 DISCUSIÓN

Esta tesis es el primer estudio local sobre la presencia de STEC en canales bovinos listos para ingresar a la línea de producción de alimentos para consumo humano. Si bien en el país los frigoríficos exportadores realizan controles de las “big six” (O26, O45, O103, O111, O121 y O145) y O157:H7, no existían datos a propósito de la diversidad de las STEC presentes, los distintos serogrupos, secuenciotipos, genes de virulencia, la presencia de elementos genéticos móviles y de genes de resistencia. Para relevar estas características se utilizaron distintas metodologías con el objetivo de comparar los resultados obtenidos en las diferentes aproximaciones, y tener una noción de la aplicabilidad de las herramientas disponibles para el estudio de estos patógenos.

6.1 Prevalencia genes *stx* y recuperación de STEC

En la primera etapa, se determinó por PCR a tiempo real la presencia de genes *stx* en los caldos de enriquecimiento de las muestras de esponjeados de las medias canales (como un primer indicador de la presencia de STEC, teniendo en cuenta las salvedades mencionadas anteriormente). De las 800 canales analizadas, 179 (22,3%, IC95 19,5%-25,3%) resultaron positivas a genes *stx*, lo que representó a 29 de los 37 (78.4%) frigoríficos muestreados, 20 de exportación y 9 de abastecimiento local. En frigoríficos de abasto el 57% (IC95 44.9%-69.1%) 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% (IC95 17.1%-22.9%). Estos porcentajes son comparables con los reportados por Brusa *et al.* (2020) encontrando en Argentina una prevalencia de *stx* en superficies de canales en mataderos que aplican y no aplican HACCP-STECC fue de 23.3% (18.8–41.6) y 42.7% (36.2–63.8), respectivamente [98]. Otros valores comparables con los obtenidos en este trabajo, son las prevalencias informadas por USA (23.0 y 60.6 %) y el Reino Unido (27.0 %) [181,182,183]. Si bien estos datos fueron obtenidos a nivel de carcasa y por PCR como en nuestro estudio, es muy difícil realizar comparaciones directas de los resultados obtenidos, ya que cualquier variación en la metodología (superficie

muestreo, enriquecimiento, tipo y cebadores de la PCR) puede influir en los resultados obtenidos.

Por otra parte, la prevalencia de genes *stx* a nivel de la zona de descarga fue menor, 19.5% (IC95 16.8%-22.2%), lo que resultó esperable por diferentes motivos. Este valor se asocia con la presencia de bacterias viables y cultivables portadoras de los genes *stx*, principalmente STEC, aunque no exclusivamente. Esta disminución en la prevalencia de genes *stx* en la zona de descarga vs. la del caldo de enriquecimiento, puede deberse a que en el segundo pueden amplificarse genes *stx* que están presentes en fagos libres, u otras bacterias portadoras de los genes, que no logran crecer en MacConkey o EMB, y por lo tanto no se detectan en el PCR realizado sobre la placa de aislamiento [187,188,189]. También cabe destacar que para la detección en caldo se utilizó PCR a tiempo real, técnica más sensible que la PCR a tiempo final utilizada en la zona de descarga y las colonias individuales. En cuanto al tipo de *stx* en la zona de descarga la mayoría 85.8% presentó señal positiva para genes *stx2* (solo o junto a *stx1*) asociados con cuadros más severos en seres humanos.

Si bien 179 caldos fueron *stx* positivos, solo se obtuvieron aislamientos sospechosos de STEC en 121 (prevalencia estimada 15.1%), resultados similares a los obtenidos por Cobbold *et al.* (2004) [184]. Este valor a su vez fue disminuyendo a lo largo de los sucesivos pasos de descongelamientos de las cepas conservadas, observándose una pérdida de la señal *stx* en un 23.8% de los aislados congelados. Esto dejó un número final de STEC confirmadas de 90, lo que representa una tasa de recuperación de 50.3% y una prevalencia final de STEC recuperadas de 11.3% (IC95 9.1%-13.4%), fenómeno descrito previamente en 2018 por Senthakumaran *et al.* [185]. Esta tasa de aislamiento se encuentra en concordancia con las reportadas por Breum y Boel (2010) y Arthur *et al.* (2002), de 21% y 54%, respectivamente [183,186]. Esta variabilidad destaca la sensibilidad relativa de las diferentes metodologías de muestreo y análisis, y cómo éstas pueden influir en los resultados. En el caso de este estudio, la diferencia no solo se podría atribuir a la sensibilidad relativa de los dos métodos de PCR y la presencia de ADN de fagos, sino también al sesgo generado en la selección de las 50 colonias a confirmar.

La pérdida de la señal a lo largo de los subcultivos en el laboratorio puede deberse a la pérdida de los fagos que codifican *stx*, incluso luego del primer repique. De hecho, existe un consenso cada vez mayor de que se necesita más investigación para evaluar el impacto de los fagos

libres portadores de *stx* o como la integración y pérdida de fagos Stx de los genomas bacterianos influye en la detección y confirmación de STEC, como falso positivo (PCR-positivo pero sin *stx* integrado en el genoma) o falsos negativos (PCR negativo pero con *stx* presente no integrado), tienen en el control de estos patógenos en los alimentos [187].

En 25 de los 29 establecimientos con señal positiva para *stx* en el caldo de enriquecimiento se recuperó al menos un aislado STEC. Para la caracterización detallada se seleccionaron cepas STEC de todos los establecimientos positivos considerando la contribución de cada uno al número final de canales *stx* positivas. Sin embargo, en 5 de los establecimientos con aislamientos positivos en la etapa inicial no fue posible continuar con la caracterización ya que al descongelar las cepas no volvieron a presentar señal positiva de *stx*, por lo que las 50 cepas seleccionadas representaron a 20 frigoríficos, 7 de abasto y 13 de exportación. Luego de la secuenciación, hubo 11 cepas de las 50 estudiadas que no contenían genes codificantes para *stx*. De todos modos, la representación de los frigoríficos no se vio afectada, ya que las cepas en las que se perdió la señal pertenecían a establecimientos con más de un aislado a caracterizar. De las señales perdidas, 8 cepas habían dado previamente *stx1/stx2* (72.7%) y 3 *stx2* (27.3%). Este fenómeno ya ha sido descrito previamente en varios reportes [188,189]. Es de resaltar que el 100% de las cepas que perdieron señal tenían *stx2*, lo cual hace difícil poder valorar el rol de estas cepas como patógenos para seres humanos, ya que tendrían una plasticidad génica con la capacidad de perder y captar fagos Stx y otros genes de virulencia [190, 191].

6.2 Asociación de variables estudiadas y la frecuencia de genes *stx* en caldo de enriquecimiento.

Se evaluó si la prevalencia de *stx* se veía influida por la estacionalidad del sacrificio animal, no encontrándose asociación ($p=0.5977$). Este resultado difiere con los datos obtenidos en un trabajo realizado en Estados Unidos por Barkocy-Gallagher *et al* (2003), quienes reportaron una mayor prevalencia en carcasas bovinas en estaciones cálidas [192]. En tanto, Cobbold *et al*. (2004) probaron que la estación se asociaba significativamente con la prevalencia de *stx* y STEC ($p=0.01$). La prevalencia de las muestras STEC positivas en otoño (9%) fue mayor que en

invierno (5%). De manera similar, la prevalencia de *stx* fue mayor para las muestras de otoño (21%) que para las muestras de invierno (10%). De todos modos, no se pudo asegurar si se trataba de un efecto estrictamente climático o si se encontraba relacionado con prácticas de manejo estacional y ciclos de producción específicos del hemisferio norte [184].

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 medias canales provenientes de vaquillonas y novillos representaron la categoría con mayor número de muestras positivas. La mayor prevalencia de STEC en animales más jóvenes ha sido descrita por varios autores y si bien las razones de tal diferencia entre los grupos de edad aún se desconocen, pueden deberse al desarrollo ruminal, la dieta y la resistencia a las infecciones, entre otros factores que afectan la composición de la microbiota intestinal [193].

En relación a la declaración de la aplicación de intervenciones antimicrobianas se demostró que su aplicación incidía en la disminución de muestras *stx* positivas ($p=0.0002$). Este resultado coincide con trabajos anteriormente publicados que muestran disminuciones en la prevalencia al aplicar intervenciones, tanto de *Escherichia coli* O157:H7 y genes *stx* [194,195]. Al analizar la prevalencia de *stx* en función del tipo de frigorífico se observó que este factor influía sobre el número de muestras positivas. En frigoríficos de abasto se identificó una positividad 6 veces mayor que la encontrada en frigoríficos 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.

Otra de las variables evaluadas fue la presencia 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.* (2003) que determinaron que la principal fuente de contaminación de las canales durante su procesamiento es el cuero bovino [196].

Por otra parte, se evaluó la influencia del sistema de alimentación de los animales antes del sacrificio en la prevalencia de *stx*, no hallando asociación entre ambos ($p=0.9470$). Esta situación coincide con diversos trabajos que sostienen que el tipo de alimentación no incide en la prevalencia global de *stx* [184,197]. En relación al tipo de faena animal no se encontró asociación entre ésta y la prevalencia de *stx* presentando un valor $p=0.5977$. Es importante

no perder de vista la limitación de la poca frecuencia de faena ritual en relación a la faena tradicional.

6.3 Prevalencia *Escherichia coli* O157:H7

En 2 de las 800 muestras analizadas se recuperó *E. coli* O157:H7 (prevalencia 0,25%, IC 95 0%-0,6%). Dado que ambos aislados procedían del mismo establecimiento, con la misma fecha de muestreo y el mismo perfil de virulencia básico definido (*stx1/stx2/eae*), se optó por la caracterización fenotípica y por WGS de una sola de las cepas.

Otros trabajos publicados reportaron prevalencias de 2.7% en 258 canales refrigeradas en México [198], 2.8% en 576 canales **pre intervención** en Nueva Zelanda [183], 3% en 132 canales en Irlanda [199], 2.4% sobre 300 canales en Estambul [200], 0.5% en un estudio realizado en Etiopía con una metodología de muestreo similar a la utilizada en este proyecto [201]. Asimismo, un estudio realizado en mataderos de exportación en Argentina sin intervenciones post faena, reportó una prevalencia de 2.6% procesados por separación inmunomagnética [202] y no se encontró O157:H7 en otro estudio que analizó pools de muestras a partir de 641 canales en un matadero con un diseño integral HACCP [109]. La menor prevalencia encontrada en nuestro estudio puede deberse, en parte, a que la mayoría de STEC provienen de canales (n=499, 62%) de mataderos que declararon aplicar medidas de mitigación.

6.4 Identificación bioquímica por MicroScan

Las 50 cepas seleccionadas se identificaron como *Escherichia coli* utilizando los paneles MicroScan. Todos los aislados dieron resultado positivo en las siguientes pruebas: arabinosa, glucosa, prueba de oxidación-fermentación. A su vez, las 50 cepas fueron negativas para las pruebas de acetamida, citrato, hidrólisis de esculina, sulfuro de hidrógeno, malonato, oxidasa, tartrato, triptófano desaminasa, ureasa y Voges-Proskauer. Se observaron reacciones variables en todas las demás pruebas, aquellas con mayor variabilidad fueron: descarboxilación de arginina 52% positivas, indol 52% positivas, nitrato 54% positivas,

rafinosa 80% positivas y fermentación de sacarosa con un 82% de positivas; y no se constató ninguna asociación entre serogrupos y los perfiles bioquímicos. Dentro de los resultados obtenidos llamó particularmente la atención el porcentaje de aislados indol negativos, ya que esta prueba había sido realizada previamente como tamizaje al seleccionar las colonias de la placa de MacConkey. De todos modos, cabe resaltar que en aún aquellas muestras donde la prueba de indol era negativa, la identificación realizada por el MicroScan fue *Escherichia coli*.

Tres de los aislados no utilizaron sorbitol: H20 (O157:H7), H9 (O174:H21) y H22 (O-:H21), lo que indica que MacConkey-Sorbitol, que se desarrolló para la detección de STEC O157:H7 sorbitol negativo [203], no resulta 100% específico para este serogrupo en casos como este donde la prevalencia de este serogrupo fue muy baja (0.25%).

6.5 Distribución de serotipos en las cepas STEC confirmadas por WGS

Para conocer la distribución de los distintos serogrupos de las STEC seleccionadas se tomaron en cuenta solo aquellas cepas que confirmaron ser *stx* positivas luego de la secuenciación (39 de 50). Se obtuvieron resultados de serotipificación por tres métodos distintos: Serotype Finder del CGE, ARIES (Galaxy) y por aglutinación con sueros. Como puede verse en la tabla 40, hay algunas cepas que no pudieron ser serotipadas por alguna de las tres metodologías o dieron resultados inconsistentes.

Los aislamientos H5 (O182:H25), H6 (O88:H25) y H32 (O20:H7) fueron serotipados molecularmente. Al mismo tiempo, dos aislamientos definidos por la prueba de aglutinación como O156:H10 (H8, H27) no pudieron ser identificados como tales ni por el Serotype Finder del CGE ni por Aries. Otras diferencias entre la serotipificación molecular y al asignarlo con sueros se dio en las cepas H31 y H39 (tabla 40).

Por otra parte, el Aries no logró serotipificar la cepa H19 y dio resultados diferentes a los otros dos métodos en la cepa H46. Si bien el Aries usa la misma base de datos que el CGE, no se especifica cuándo fue la última actualización.

ID H	Serotype Finder	ARIES	Aglutinación
5	O182:H25	O182:H25	no analizada
6	O88:H25	O88:H25	no analizada
8	OND:H10	OND:H10	O156:H10
19	O120:H7	ND:H7	O120:H7
27	OND:H10	OND:H10	O156:H10
31	O130:H11	O130:H11	O159:H28
32	O20:H7	O20:H7	O?:H7
39	O99:H19	O99:H19	O10:H42
46	O39:H-	O116:H49	O39:H-

Tabla 40. Cepas *stx+* que presentan discrepancias entre las metodologías de serotipificación.

Algunas hipótesis para explicar las diferencias entre la serotipificación molecular y por aglutinación en nuestro estudio son que estamos ante nuevas variantes o nuevos serogrupos aún no descritos, y por tanto no incluidos o actualizados en la base de datos utilizada, o cepas que presentan reacción cruzada con sueros de otros serogrupos. Lo mismo ocurrió cuando Castro *et al.* (2021) compararon los resultados de PCR y WGS para definir los serogrupos de *E. coli* [187]. Se piensa que también los resultados discrepantes pueden deberse a modificaciones de secuencia en los grupos de genes de biosíntesis del antígeno O (O-AGC) [204]. Se podría realizar más investigación de estos resultados utilizando nuevas bases de datos y algún estudio adicional para la determinación de serogrupos inestables.

Salvo para aquellas cepas que no pudo asignarse el serogrupo mediante WGS, se tomaron los resultados asignados por el Serotype Finder para evaluar las frecuencias, obteniéndose 20 grupos O y 13 H tipos diferentes, así como una cepa que no era tipificable (O-). Solo se incluyó una cepa O157:H7 y entre los 38 aislados no O157 predominaron los serotipos O130:H11 (n=7), O22:H8 (n=5) y O174:H21/28 (n=5) (Figura 27).

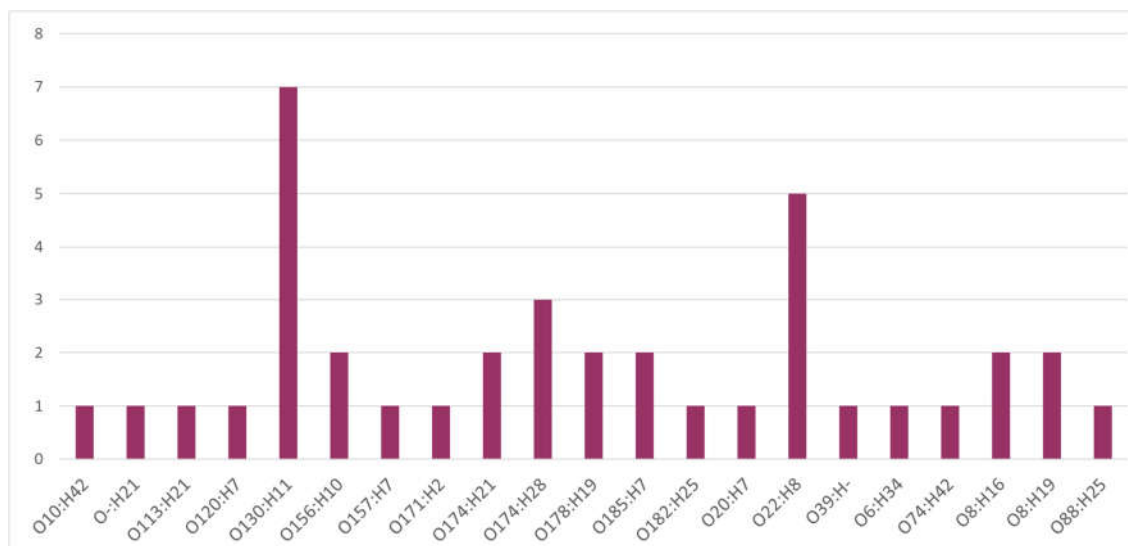


Figura 27. Frecuencias de serotipos de las 39 STEC confirmadas luego de WGS.

Este estudio es una de las primeras experiencias en Uruguay que incluye esta cantidad de secuencias de ADN de STEC no-O157 aisladas de canales bovinas enfriadas listas para entrar en etapas de desosado y fraccionamiento en los diferentes cortes. Al estudiar los resultados obtenidos en otros países se observa que los serogrupos encontrados son frecuentemente hallados en fuentes bovinas. En Argentina, se han realizado varios trabajos para estimar la ocurrencia de STEC en heces, canales y pieles de ganado para faena. Cap *et al.* (2019), informó aislamientos de STEC pertenecieron a los serotipos O103:H2, O113:H21, O130:H11, O171:H2, O178:H19 obtenidos de cueros y carcasas [206]. En 2017, Brusa *et al.* presentó un trabajo donde estudió cepas no O157 aisladas de canales, cortes y recortes de vacuno en mataderos, e identificaron O8:H19, O130:H11, O174:H21, O178:H19 y O185:H7 como los serotipos más prevalentes [109]. Masana *et al.* (2011) realizó un estudio en carcasas en nueve frigoríficos, hallando como principales serotipos O178:H19, O8:H19, O130:H11 y O113:H21, los cuales han sido aislados también en casos esporádicos de SUH en Argentina y el mundo [108].

Estos últimos estudios concuerdan con reportes, que mostraron que no-O157, y particularmente O130:H11 y O178:H19, son los serotipos frecuentes entre las cepas de STEC aisladas de vacas lecheras, mataderos de carne y ganado de engorde en Argentina [207]. En Brasil, se ha observado variabilidad en las tasas de aislamiento y serotipos informados de cepas STEC bovinas. Los análisis comparativos muestran que STEC pertenecientes a O22:H8,

O22:H16, O113:H21, O116:H21 se han aislado comúnmente del ganado bovino en diferentes regiones brasileñas [208,209,210]. En un análisis de 105 cepas STEC aisladas de 1562 muestras fecales positivas para *stx* de ganado sano en Río de Janeiro, Gonzales *et al.* (2016), encontraron que O157:H7 fue el serotipo más prevalente (12,4%), seguido de O113:H21 (7%) y O8:H19 (6%) [210].

En Estados Unidos, Bosilevac & Koohmaraie (2011) realizaron un estudio en 4133 muestras de carne picada del mercado, encontrando 99 serotipos diferentes de STEC, siendo los más frecuentes O113:H21 (9.5%), O8:H19 (4.4%) y O117:H7 (4.7%) [211]. Otro estudio realizado en 450 canales de 3 mataderos estadounidenses caracterizaron 40 aislamientos distribuidos en 12 serotipos: O5:H-, O13:H2, O26:H11, O33:H11, O55:H11, O113:H4, O128:H8, O136:H12, O138:H48, O150:H2, O168:H8 y ONT:H11 [181,207].

Los informes de los serotipos encontrados en este proyecto relacionados con brotes humanos han ido en aumento [212]. Sin embargo, en Uruguay, en los casos de SUH con recuperación de STEC predominan los serogrupos O26, O111 y O145 [22]. En Argentina, con un sistema de vigilancia más integral y robusto que el nuestro, las STEC no O157 están vinculadas al 26% de los casos de SUH, siendo los serogrupos más frecuentes O145, O26, O121 y O103 [22,17]. Ninguno de estos serogrupos no-O157 se recuperó en este trabajo. Esto puede deberse al bajo número de cepas analizadas (39 STEC confirmadas por WGS) y algún sesgo en su selección; a que estas cepas no son tan frecuentes con relación a otras STEC en bovinos; a que no utilizamos procedimientos de inmunocentración ni medios cromogénicos que nos permitan identificarlos selectivamente; o que su reservorio principal no sea el ganado vacuno. También puede ser que esté relacionado con las cepas STEC que producen SUH puedan provenir de otras fuentes como lo indican la EFSA y la FAO/OMS [213,214]. Los datos sugieren un rol menor de los alimentos de origen vacuno en la transmisión de STEC O157:H7 o que la contaminación con este serotipo ocurriría en etapas posteriores de la producción.

6.6 Resistencia antimicrobiana

Ninguna de las 39 cepas identificadas como STEC luego de la WGS mostró resistencia a los antimicrobianos probados por la técnica de disco-difusión.

La cepa H39 del serotipo O99:H19 portó los genes de resistencia para doxiciclina, tetraciclina, minociclina - *tetB* (100 % de identidad), sulfonamidas - *sul2* (100 % de id) y estreptomicina - *aph(3'')-Ib* y *aph(6)-Id* (100% identificación). La resistencia a tetraciclina (TE) y minociclina (MIN) fue confirmada por Microscan mostrando valores de MIC >8 µg/mL para ambos. La resistencia a la doxiciclina, la estreptomicina o las sulfonamidas no se probó mediante difusión en disco o MicroScan. Las tetraciclinas son antibióticos de amplio espectro que inhiben la elongación de péptidos y se consideran de importancia “crítica” y “muy importantes” para la medicina veterinaria y humana, respectivamente. Generalmente, las tetraciclinas están indicadas para el tratamiento de infecciones bacterianas como neumonía; infecciones de la piel; infecciones de huesos y articulaciones; infecciones de transmisión sexual; infecciones intraabdominales; patógenos de amenaza biológica, incluidos *Yersinia pestis*, *Bacillus anthracis* y *Francisella tularensis*; y otros patógenos bacterianos específicos como *Rickettsia* spp, *Borrelia* spp y micobacterias no tuberculosas [215].

La resistencia a la tetraciclina ocurre con mayor frecuencia por la adquisición de genes que codifican bombas de expulsión, proteínas de protección ribosómica o por inactivación enzimática [216]. Muchos de los genes involucrados en estos mecanismos están asociados con elementos móviles, y la mayoría de ellos codifican proteínas de eflujo de resistencia. La presencia de estas resistencias y del gen *tetB* en STEC ha sido previamente descrita en aislamientos de bovinos chilenos y carne de Egipto [217, 218].

En la cepa H19 - O120:H7 se encontró el gen *fosA7*, que confiere resistencia a la fosfomicina, pero no se observó la expresión fenotípica ni por disco difusión ni por MicroScan, lo que puede ser debido a que el gen no se expresa completamente o que el nivel de expresión es muy bajo. La presencia de este gen ha sido reportada en *E. coli* ambiental y *Salmonella* spp. de origen animal y humano y también en STEC de bovinos de nuestro país [219, 220].

Según los resultados obtenidos por Aries, BlaEC (*bla_{EC-15}* y *bla_{EC-18}*), que codifica para la resistencia a betalactámicos, estaba presente en 37 de las 39 cepas STEC confirmadas (94.9%). Esta proteína es una serina beta-lactamasa con especificidad de sustrato para las cefalosporinas. La expresión basal es baja y tiene impacto sobre cefalosporinas de 1era. generación (cefalotina). Cuando son sobreexpresadas pueden inactivar ceftioxitina y cefalosporinas de 3era generación [221]. En el MicroScan se obtuvieron 22/39 cepas de STEC

con resistencia a la cefalotina (2 con resistencia y 20 con resistencia intermedia) según la edición 25 del CLSI [177].

Aunque muchos autores no recomiendan el tratamiento con antibióticos en infecciones por STEC, es importante tener en cuenta la asociación de mecanismos de resistencia a elementos genéticos móviles que dan a las bacterias, incluyendo STEC, la capacidad de transferir genes de resistencia. Al mismo tiempo, es importante resaltar la importancia del enfoque de Una Salud, para entender que los alimentos no solo actúan como vehículos de patógenos, sino también de genes de resistencia transferibles que en ocasiones no podrían ser detectados si no se emplean técnicas genéticas con alta capacidad de cribado como la WGS [213].

6.7 Factores de virulencia

6.7.1. Subtipos de *stx* y *eae*

Los subtipos de *stx* fueron asignados por PCR *in silico*, ya que tanto la base de datos de Aries como la del Virulence Finder no logró discriminar el perfil de las siguientes cepas: H3 (*stx2b/c*) y H47 (*stx2a/b*)

La distribución de los subtipos de *stx* portados por las cepas analizadas se resume en la figura 28.

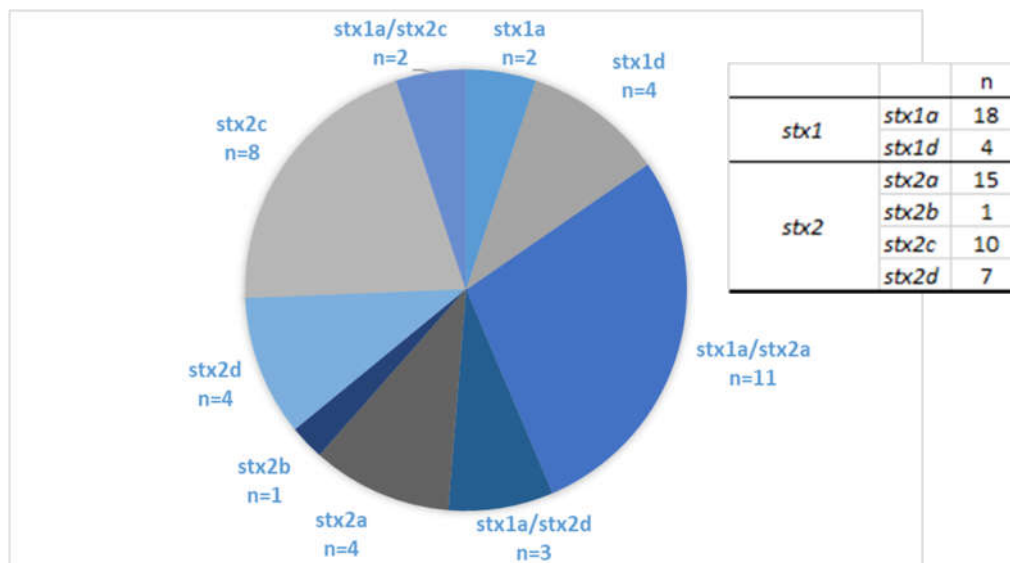


Figura 28. Subtipos de *stx* detectados en las cepas STEC estudiadas.

Treinta y tres de las cepas (84.6%) portaban *stx2* solo o asociado con *stx1*. Resultados similares fueron publicados por Brusa *et al.* (2017), que reportaron una mayor prevalencia entre las cepas no - O157 estudiadas de *stx2* (74,5%), seguida por distintas combinaciones de *stx1/stx2* (23%). Al igual que nuestro trabajo el subtipo de *stx2c*, fue el mayormente detectado de modo individual (34,5%) [109]. Otro estudio realizado en cepas STEC de frigoríficos de abasto en Argentina también reportó a la toxina Stx2 como la más prevalente (*stx2* y *stx1/stx2* detectadas en un 85,3% y 17,7% de los aislados, respectivamente) [222]. El subtipo Stx2 está relacionado con linajes más virulentos, presentando una DL50 por gramo, 400 veces menor que Stx1 en modelos murinos [223]. Entre los subtipos de Stx, Stx2a, Stx2b, Stx2c o Stx2d se han asociado con mayor frecuencia con el desarrollo de SUH en pacientes infectados, mientras que los otros subtipos de Stx se han asociado con enfermedad leve en humanos sin complicaciones o asintomáticos. En general, *stx2a*, solo y en combinación con otros subtipos de *stx*, tuvo las tasas más altas de SUH, hospitalización y DS. En ausencia de *eae*, *stx2d* también se asoció con una tasa de SUH relativamente alta (10.3%) [213]. Al mismo tiempo, Stx2a se asocia epidemiológicamente con un aumento de los niveles de excreción de STEC O157 del ganado bovino y de la transmisión entre animales. Podría deberse a que se produce más rápidamente que otros subtipos de Stx y limita la proliferación celular de las células epiteliales bovinas [217].

Con respecto al gen *eae*, solo 2 aislados fueron positivos: H5 - O182:H25 con subtipo *eae*-ζ y la H20 - O157:H7 con subtipo *eae*-γ. Como ya se discutió anteriormente, la intimina está presente en la mayoría de las STEC asociadas a los casos de enfermedad severa, pero no en todos [213]. Actualmente no hay datos suficientes para probar una asociación entre la variante de intimina y el tipo de enfermedad, pero sí existen algunas vinculaciones entre subtipos de *eae*, *stx* y serogrupos [213]. Por ejemplo, los serotipos O157:H7 y O145:H28 están asociados con el subtipo *eae*-γ y los aislamientos de STEC O157 se asociaron fuertemente con la presencia simultánea de los genes *stx2* y *eae*, lo que explicaría en parte por qué STEC O157 predomina en pacientes con SUH [224]. Además de que el subtipo γ de *eae* se asocia con SUH y O157:H7, también se encontró una relación con la presencia de *stx2a+stx2c* y *stx1a+stx2c*, subtipos de *stx* altamente virulentos, lo que también podría contribuir a la gravedad de los síntomas clínicos [225]. En Uruguay, se recuperaron cepas de STEC de niños con SUH con *eae* de subtipos γ y β, lo que destaca la importancia clínica de estas variantes [226]. Por otro lado, el subtipo *eae*-ζ fue descrito por primera vez en Alemania en una cepa STEC proveniente de ganado [227]. Se reportó también, en una investigación realizada en China, que el 88.5% de 26 aislamientos obtenidos de bovinos portaban el subtipo ζ, evidenciando así una posible relación de este subtipo con el origen vacuno [224].

6.7.2. Factores de virulencia adicionales

La frecuencia de los genes de virulencia detectados en las 39 cepas STEC caracterizadas por los tres métodos (Virulence Finder, Aries y PCR *in silico*) se resume en la figura 29 a continuación.

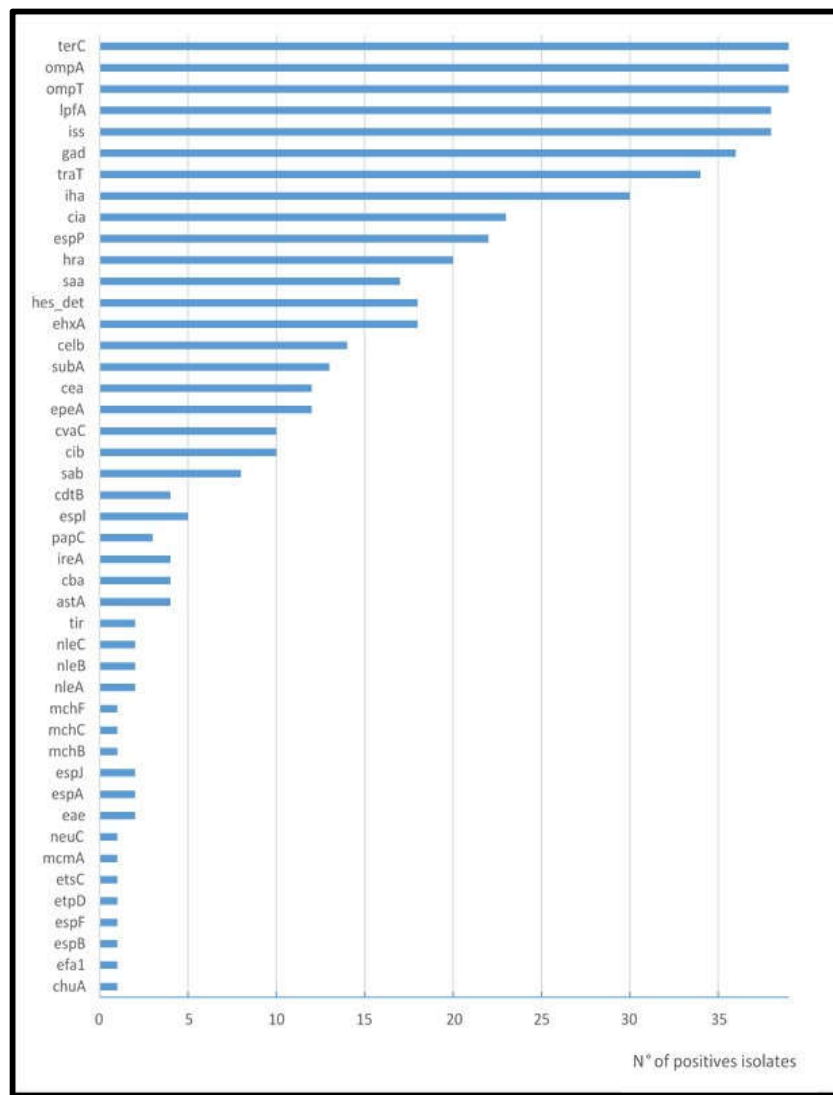


Figura 29. Prevalencia de genes de virulencia.

Entre las cepas de STEC confirmadas investigadas (n=39), se identificó una alta variabilidad de perfiles de genes de virulencia. La cepa H1 - O130:H11 poseía el mayor número de dianas genéticas asociadas a la virulencia, con 21 genes detectados. Además del gen *stx2a*, esta cepa presenta genes asociados a islas de patogenicidad como *iha*, y a los plásmidos *epeA* (pO113), *espP* y *ehxA* (pO157). En relación a la cantidad de factores de virulencia, a esta cepa le siguen 3 O174:H28 (H18, H26 y H50) con 20 genes de virulencia, y la O157:H7 con 19 genes de virulencia de los 124 genes buscados.

Se examinó en detalle el perfil de virulencia para detectar cepas híbridas en busca de marcadores de virulencia encontrados en cepas LEE negativas de origen animal o humano, que fueron reconocidos en otros patotipos; *ipaH* como indicador de *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) y *aggR*, *aat* y *aaIC* como marcadores de *E. coli* enteroagregativa (EAEC). Ninguno de estos genes se encontró en las 39 STEC cepas analizadas. A modo de ejemplo, en Argentina existen hallazgos de cepas STEC LEE- positivas para *aggR* recuperadas tanto de carne bovina (O178:H19) [109], como de pacientes con SUH (O174:H21, O59:H19) [228,229]. Es importante mantener la vigilancia de estos genes en cepas STEC, que no se buscan rutinariamente en los controles de alimentos, para detectar la aparición de estas cepas emergentes en nuestro país.

Solo 2 aislados tenían el gen *eae*, uno de los marcadores de virulencia más relevantes vinculados a la adherencia y severidad de STEC. Es así, que en este estudio el 94.9 % de las cepas analizadas fueron LEE negativas, pero albergaban diferentes genes codificadores de adhesinas, incluidos *lpfA* (n=38), *iha* (n=31), *espP* (n=22) y *saa* (n=18). LpfA corresponde a una proteína de subunidad fimbrial mayor que puede interactuar con fibronectina, laminina y colágeno IV, e *iha* codifica a una adhesina homóloga de IrgA de *Vibrio cholerae*. Ambos genes, *lpfA* e *iha* han sido detectado previamente en cepas aisladas de ganado [230,231]. EspP es una proteasa de serina extracelular que contribuye a la colonización intestinal bovina, mientras que Saa aumenta la adhesión a las células HEp-2 casi 10 veces, estando también relacionada con la formación de biofilms, que quizás podrían favorecer la adherencia y perpetuidad de las cepas en ambientes industriales [232].

Se detectaron genes adicionales codificadores de toxinas como *ehxA* (46% de los aislados), *subA* (33%) y *cdtB* (10%), estos dos últimos solo detectados en cepas LEE negativas. La enterohemolisina codificada por el plásmido (EhxA) tiene la capacidad de formar poros en varias membranas de células eucariotas y está ampliamente distribuida en las cepas STEC [233]. La asociación de los genes de virulencia *saa/ehxA* ha sido reportado por varios autores, tanto de cepas aisladas de animales como de carcasas. En este trabajo, esta combinación se dio en el 46% de los aislados, prevalencia comparable con la reportada en la región [109,234,230]. SubAB integra la familia de toxinas AB5, es altamente tóxica para una variedad de tipos de células, induce la vacuolización y la inhibición temporal de la síntesis de proteínas, y tiene un efecto sinérgico con Stx2 en el daño de las células endoteliales glomerulares

humanas, lo que contribuye al desarrollo de SUH [235]. Por último, la CDT provoca la detención irreversible de G2/M, la inhibición de la proliferación y la muerte de las células endoteliales humanas [236]. La presencia de estos genes, *subA* y *cdtB*, han sido reportados previamente por otros autores que estudiaron cepas STEC de origen bovino [237,238].

Otros genes frecuentemente encontrados fueron aquellos que codifica a proteínas de membrana externa *ompA* (n=39) y *ompT* (n=39), los genes del factor de resistencia sérica *iss* (n=38) y *traT* (n=34), el gen de resistencia al telurito *terC* (n=39), el gen que codifica la glutamato descarboxilasa *gad* (n=36) y confiere tolerancia a los ácidos, y la bacteriocina colicina-la *cia* (n=23). El gen de utilización de hierro *chuA* y *efa1* solo estaban presentes en el aislado O157:H7.

Se han descrito también islas de patogenicidad (PAI) adquiridas recientemente que podrían contribuir a la adhesión de STEC, como LAA. Estas PAIs pueden presentarse como una estructura completa con sus cuatro módulos o como una estructura incompleta con algunos módulos faltantes. Algunos genes se utilizan como marcadores para esos módulos, por ejemplo, *hes* es un marcador para el módulo I e *iha* y *lesP* son marcadores para el módulo II [236]. Entre las cepas analizadas, se identificó parte de este PAI en el 76.9% de las cepas, a través de la presencia del gen *hes*. Esta prevalencia es mayor a la descrita previamente por Vélez *et al.* (2020), que estudiaron 120 cepas de STEC chilenas y paraguayas de distinto origen, obteniendo una prevalencia de *hes* de 33,6% [236]. La adquisición de esta isla se presume que es probablemente un evento evolutivo reciente en STEC [239], que podría haber contribuido a la aparición de cepas LEE-negativas con mayor virulencia.

6.7.3. Secuenciotipos y filogrupos

La tipificación por MLST reveló la presencia de 20 STs entre las cepas STEC analizadas (Tabla 32). Algunas de los STs detectados en este trabajo han sido reportadas previamente. El ST297 fue el más frecuentemente encontrado (n=6), siendo las cepas de este ST detectadas en todo el mundo a partir de huéspedes humanos y animales. Por ejemplo, se predijo a partir de genomas de cepas de STEC aisladas de humanos y de carne de res en Chile y se ha identificado como el linaje predominante en ganado de Suecia [240], y en ganado, leche, cerdos y agua de

granjas en China [241]. También se identificaron 5 aislamientos de ST446 (O22:H8), serotipo que ha sido vinculado a un efecto protector frente a O157:H7 ya que competiría por receptores en la unión recto-anal bovina, lo que hace que los terneros portadores de O22:H8 sean menos susceptibles a la colonización por O157:H7 [241,242]. Esto podría explicar, en parte, la baja prevalencia de STEC O157:H7 encontrada en este trabajo. El tercer secuenciotipo más prevalente fue el ST156 O174:H28 (n=3), hallado también previamente en carne chilena [237].

También el ST443, encontrado en este estudio, se identificó anteriormente en muestras de ganado bovino y bovino de Chile y Uruguay. O157:H7 ST11 ha sido descrito como el principal clon identificado a partir de infecciones humanas en Argentina, Brasil, Paraguay y Uruguay [236].

En la figura 30, se muestra una representación realizada por Galarce *et al.* (2021) de los secuenciotipos hallados en Sudamérica y sus orígenes partir del estudio de 130 genomas completos de STEC, lo que muestra y confirma la diversidad que existe en la región [217].

Se observó que las cepas del mismo serogrupo y el mismo ST no necesariamente compartían el mismo virulotipo, evidenciando nuevamente la plasticidad genómica de estas bacterias. Por ejemplo, los 3 aislados O174:H28 de ST156 presentan 3 perfiles de virulencia diferentes, las 6 cepas O130:H11 ST297 se distribuyen en 4 perfiles, al igual que las 5 cepas de O22:H8 ST446.

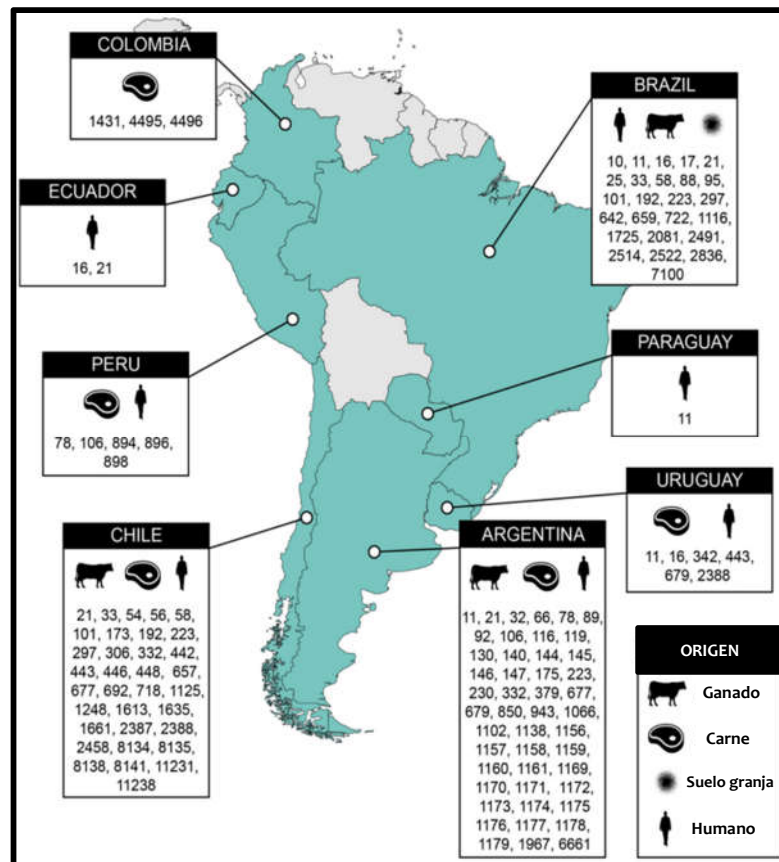


Figura 30. Distribución de los ST de las cepas de STEC que circulan en América del Sur, según el análisis de los genomas disponibles públicamente y los datos obtenidos de estudios de vigilancia previos [217] .

La mayoría de las cepas STEC analizadas en este estudio (38/39, 97.4%) pertenecían al filogrupa B1, un hallazgo similar al informado previamente en terneros de Brasil [243]. Las cepas de *E. coli* pertenecientes a los filogrupos A, B1 y D son identificadas como comensales y patógenas intestinales, mientras que las cepas asociadas a infecciones extraintestinales en humanos pertenecen sobre todo a los grupos B2 y D. En animales se informa el predominio de las cepas B1, seguido de las cepas A, B2 y, en menor medida, D [244]. La única cepa O157:H7 incluida en la caracterización perteneció al filogrupa E. Aunque las cepas de *E. coli* de los filogrupos encontrados en este estudio (B1 y E) están asociadas a enfermedades en humanos, es muy difícil establecer un vínculo entre los grupos filogenéticos y la gravedad de la infección.

Es interesante ver que se recuperaron cepas del mismo serotipo, ST y tipo Clermont de diferentes establecimientos ubicados en diferentes regiones del país. Esto puede deberse al

hecho de que, a menudo, varios mataderos son abastecidos por los mismos criadores de animales, lo que favorece la distribución de cepas STEC idénticas a diferentes establecimientos. Otro caso particular es el de las cepas H14 y H37, ambas O130:H11 que provienen del mismo matadero, diferentes canales y la misma fecha, pero mostraron diferencias en su perfil de virulencia. Esto puede deberse a la inestabilidad (por pérdida o ganancia) de genes que codifican diferentes atributos de virulencia, destacándose nuevamente así la plasticidad del genoma de estas bacterias.

6.7.4. Identificación de profagos y plásmidos

La caracterización genómica condujo a la identificación de la presencia de elementos de plasticidad en todas las cepas, como replicones de plásmidos y regiones de fagos. Al igual que se vio en trabajos previos, una variabilidad entre la secuencia de regiones profágicas proporciona la evidencia de que los aislados son cepas diferentes o que sufrieron la integración de diferentes bacteriófagos, sugiriendo que su genoma está en constante construcción y deconstrucción [245].

El tamaño de los fagos intactos hallados es muy variable, de 11.3 a 105.4 kb, estando este hecho muy relacionado con los datos obtenidos en el análisis del pangenoma y el tamaño total del genoma de cada una de las cepas estudiadas. Tantoso *et al.* (2022) relacionaron el número de profagos intactos con la patogenicidad potencial de cepas de *E. coli*, ya que tienen la capacidad de transportar toxinas y genes de resistencia a antibióticos. Es así que concluyó, que las cepas con el mayor número de profagos tienden a ser de mayor virulencia [246].

Al mismo tiempo, se pudo detectar que los genes de virulencia *traT*, *iha*, *celb*, *ehxA*, *cia*, *cib*, *cvaC*, *subA* se ubicaban en el mismo contig que secuencias plasmídicas, sugiriendo que estos factores de virulencia estaban codificados en plásmidos.

6.7.5. Estudio del pangenoma

Tantoso *et al.* (2022) realizaron un estudio de pangenomas de 1324 aislados de *E. coli*, estimando que el tamaño promedio ronda los 25000 genes [246]. A medida que se iban

agregando más cepas, este valor crecía mientras que el core genoma se mantenía estable con aproximadamente 3000 genes. Estos resultados son comparables con los obtenidos al estudiar nuestros 50 genomas, 39 STEC confirmadas por WGS y 11 no confirmadas (pangenoma 18606, core 2980). En la literatura disponible sobre análisis del pangenoma de *E. coli* se revela que: (i) Los genomas de estas bacterias son muy diversos y son menos de 1000 los genes que se comparten, mientras que decenas de miles de genes se consideran parte del genoma accesorio compartido solo por un número limitado de cepas. (ii) Con la disponibilidad de un número cada vez mayor de genomas de *E. coli*, se observa que el tamaño del pangenoma aumenta mientras que el tamaño del core genoma sigue disminuyendo [247,248]. Es así que se estipula que la tendencia de los datos es la adición continua de nuevos genes con cada genoma recién secuenciado por lo que el pangenoma de *E. coli* se considera abierto. Un pangenoma abierto indica que la especie todavía está evolucionando mediante la adquisición y diversificación de genes. Esto tiene implicancias en términos de la diversidad y patogenicidad de la especie y su capacidad para colonizar y causar enfermedades en el huésped humano [249].

6.7.6. Asociación filogenética

El análisis filogenético mediante WGS permite determinar la relación entre los aislamientos con una mayor resolución que las herramientas usadas anteriormente para tal fin, como por ejemplo la electroforesis de campo pulsado (PFGE). Es así que este tipo de análisis permite una vigilancia epidemiológica automatizada y más robusta [237].

En nuestro análisis, los genomas se agruparon en función de su perfil alélico, serogrupo y secuenciotipo en ambos árboles: cgMLST (Figura 31) y SNP del pangenoma (Figura 25). Este mismo tipo de asociación fue obtenido en una investigación en Chile que trabajaron con 62 genomas de STEC y en un estudio de los países bajos con 132 aislados [237,250].

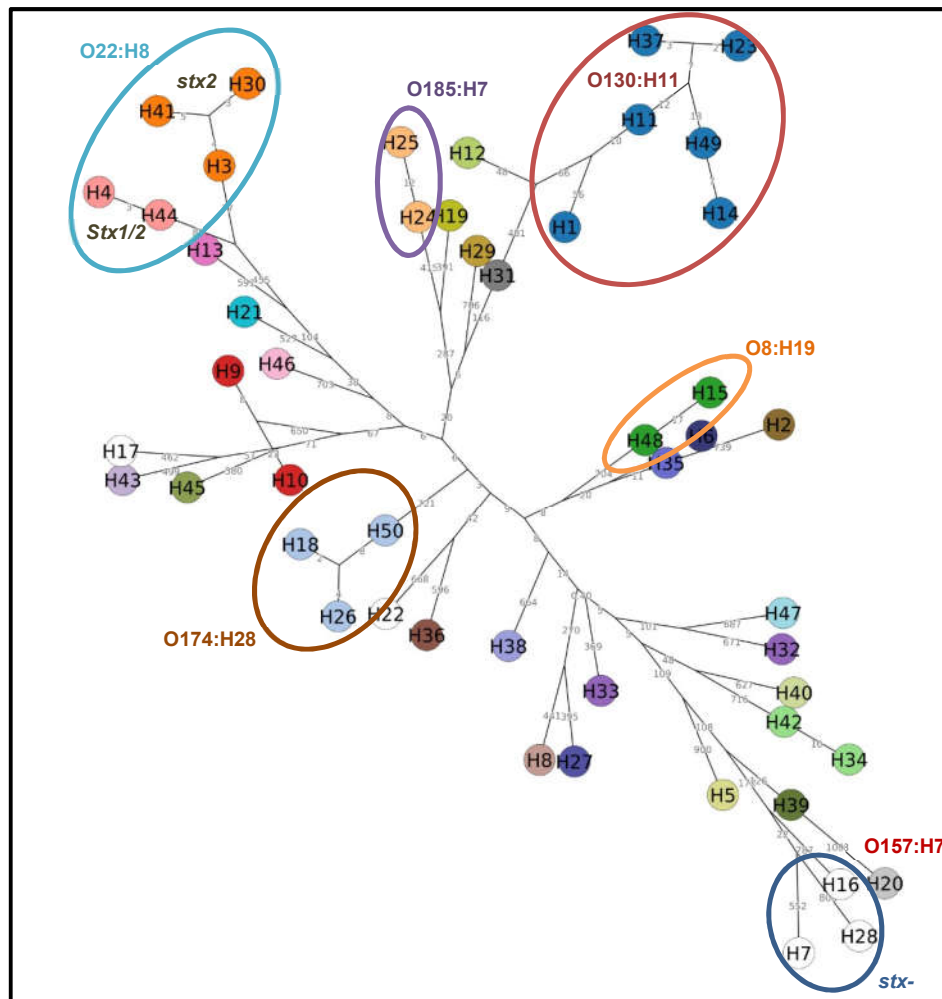


Figura 31. Asociación de serotipos y cgMLST (colores) en árbol construido a partir del perfil alélico de cada aislado.

6.7.7. Categorización de riesgo FAO/WHO

La distribución de las cepas no-O157 en los grupos de riesgo indicados por la FAO/OMS, con los serogrupos asociados, fue la siguiente:

- Nivel 1 "*stx2a+eae/aggR*": ningún aislado
- Nivel 2 "*stx2a*": 7 aislados (O22:H8{2}, O113:H21{1}, O130:H11{2}, O174:H21{2})
- Nivel 3 "*stx2c+eae*": ningún aislado
- Nivel 4 "*stx1a+eae*": 1 aislado (O182:H25)

- Nivel 5 “otros subtipos *stx*”: 30 aislamientos

Si bien al utilizar los criterios de la FAO/OMS para categorizar el riesgo de las cepas seleccionadas, la mayoría (79%) pertenecía al nivel más bajo de riesgo, algunos de los serotipos analizados en este trabajo corresponden al **nivel 2** de la FAO/OMS: O22:H8, O113:H21, O130:H11 y O174:H21. Estos serotipos han sido aislados previamente en pacientes con diarrea, colitis hemorrágica o SUH [251,252,253].

La clasificación con este criterio se puede utilizar como guía para evaluar a qué nivel de protección frente a las infecciones por STEC debe enfocarse la gestión de riesgos. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que, además de estos factores de virulencia que además se pueden perder, como se detectó en este trabajo, la progresión a un SUH se ve afectada por muchos otros parámetros, incluidos los factores del huésped, la carga del patógeno, el tratamiento con antibióticos, etc. [90].

7. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Los resultados de este estudio muestran que las STEC están presentes en la cadena cárnica, que la prevalencia de genes *stx* y STEC en canales bovinas uruguayas es similar a la comunicada por otros autores de la región. En relación a la prevalencia global de genes *stx* en medias canales, el porcentaje global en el periodo analizado fue de 22.3%, similar al encontrado en países de la región. No hay que perder de vista las limitaciones que existen al comparar prevalencias de distintos estudios y que el valor obtenido en este trabajo es una “foto” de 2 años de un proceso que se da de manera continua, con las variaciones que esto conlleva, sumadas a la plasticidad demostrada del genoma de *E. coli* en general y STEC en particular. Se evidenció que el tipo de establecimiento, presencia de pelos, aplicación de intervenciones 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*. 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 y las condiciones higiénicas durante la faena, tienen un efecto directo sobre la diseminación de la bacteria sobre la superficie animal, y por lo tanto una disminución de las chances de que STEC llegue a los seres humanos por el consumo de este tipo de alimento.

Este es el primer trabajo local que se realiza con el objetivo de estudiar las características de las cepas de STEC presentes en canales bovinas en la última fase de etapa limpia de la producción, sin realizar ninguna preselección de serogrupo, como se hace generalmente en la industria cárnica y en los organismos de control. Es así que en este estudio se muestra la diversidad de las cepas de STEC presentes, los factores de virulencia asociados, su perfil de resistencia (incluidos los genes involucrados) y el riesgo potencial de producir enfermedades graves en seres humanos.

Así, finalmente se caracterizaron 39 aislamientos STEC; uno O157:H7 y 38 no-O157 correspondientes a 19 grupos O diferentes, resultando los serotipos más frecuentes:

O130:H11 (7 cepas), O174:H21/28 (5) y O22:H8 (5), todos ellos previamente aislados de humanos, animales y alimentos derivados en otros países.

Usando WGS fue posible estudiar la presencia de múltiples factores de virulencia, genes de resistencia y determinar el tipo de secuencia y el filogruppo de este conjunto de STEC. Esta herramienta nos sigue resultando muy costosa y no se utiliza de forma rutinaria para la vigilancia epidemiológica, ni para caracterizar este grupo de patógenos en nuestro país. Sin embargo, este trabajo nos dio la posibilidad de mostrar su potencial y obtener mucha información que habría sido muy laboriosa de lograr con las técnicas tradicionales de PCR. Además, la información que se extrae de WGS tiene más detalles que los proporcionados por los métodos convencionales, por ejemplo, cuando se caracterizan las cepas de STEC en los laboratorios de salud pública del CDC de Estados Unidos, se detectan rutinariamente de 5 a 10 objetivos de virulencia y 9 susceptibilidades antimicrobianas mediante métodos convencionales, mientras que por WGS se analizan por corrida aproximadamente 100 determinantes de virulencia y resistencia [179]. La secuenciación del genoma completo resulta también una herramienta poderosa para la serotipificación, ya que hacerlo por serología implicaría tener a disposición los sueros para 188 grupos O y 53 grupos H. Además, otros grupos [120] han demostrado que el tiempo de respuesta para WGS es más rápido en comparación con los flujos de trabajo convencionales de subtipificación e identificación aislados, bajando los tiempos de 1-3 semanas a 2-4 días cuando se aplica la tecnología rutinariamente. Si bien la aplicación de la tecnología puede implicar una inversión inicial significativa, los costos analíticos por aislado pueden resultar menos que si se realizara todo el flujo de trabajo de tipificación tradicional para obtener la misma información que al aplicar WGS [120]. Adicionalmente, los datos de las secuencias proporcionan un nivel de precisión y discriminación de las cepas superior que cualquier método de subtipificación utilizado hasta ahora para la detección e investigación de brotes [179].

Más allá del sesgo en la selección de las STEC analizadas, los datos obtenidos sugieren que el ganado bovino constituye un reservorio local a tener en cuenta para los serotipos no O157 asociados a enfermedades en humanos. En ese sentido, aunque la mayoría de los aislamientos estudiados pertenecían a los niveles de menor riesgo FAO/OMS, algunos de los serotipos analizados correspondientes al nivel 2 (O22:H8, O113:H21, O130:H11 y O174:H21) fueron previamente aislados en otros países de pacientes con diarrea, colitis hemorrágica o

SUH. Se necesitan otros estudios para definir la participación local de estos serotipos en estas patologías humanas.

Al mismo tiempo, cabe resaltar la ausencia de recuperación de serogrupos no-O157 asociados a casos de SUH en Uruguay, así como la conclusión que del ganado bovino no parece ser un reservorio importante de cepas O157:H7, al menos en esta etapa de la producción cárnica y en este periodo del estudio.

Por otro lado, resultaría interesante seguir trabajando con estas secuencias comparándolas con los genomas de STEC disponibles en el NCBI aisladas de animales y pacientes humanos de todo el mundo. La literatura reciente indica que el contenido genómico de estas cepas está fuertemente influenciado por la ubicación del aislamiento y la plasticidad genómica de *E. coli* permitiría seguir la evolución de una población de STEC en una región definida [241]. Si las cepas de Uruguay se agruparan filogenéticamente separadas a las del resto del mundo podríamos diferenciar características únicas vinculadas a las cepas de nuestro país, que nos permitiría defendernos en caso de hallazgos en brotes en países importadores de nuestras carnes. También podría resultar interesante estudiar en detalle el genoma de las 11 cepas definidas inicialmente como STEC que no se confirmaron por WGS y valorar su capacidad para incorporar nuevamente fagos Stx, así como las condiciones que fomentan la pérdida de estas secuencias.

En paralelo, el estudio de la prevalencia de serogrupos específicos (“big six”, principales serotipos causantes de ETAs del país, de determinada región, etc.) podría también ser de gran interés para entender más la epidemiología de estas bacterias. Los caldos de enriquecimiento de este proyecto conservados a -80°C podrían ser utilizados para estas búsquedas.

La información recopilada en la presente tesis da un puntapié inicial para llegar a una mejor estimación del riesgo de STEC no O157 en la industria de carne vacuna de Uruguay y la región americana. Dado que otros vehículos pueden estar involucrados en la propagación local de STEC, se deben realizar estudios similares a este, que incorporen análisis por WGS, que incluyan un mayor número de cepas recuperadas de la carne de res, en otras etapas de la cadena productiva, puestos de venta, otros alimentos y el medio ambiente para tener un mejor vínculo epidemiológico con casos de humanos.

Desde otro punto, tomando como inicio los resultados obtenidos en este trabajo, se podría trabajar en estrategias de reducción de STEC en el manejo del animal pre faena. También los aportes de esta tesis a propósito de factores de colonización presentes en las cepas STEC analizadas, podrían ser de utilidad para la identificación de antígenos comunes capaces de producir una respuesta inmune a nivel intestinal, para el diseño y elaboración de vacunas.

En resumen, como continuación de esta línea de investigación se podría seguir trabajando en:

- Utilizar las secuencias obtenidas para realizar estudios comparativos con genomas de STEC aisladas de distintas fuentes disponibles en bases de datos.
- Profundizar en el genoma de las 11 cepas definidas inicialmente como STEC que no se confirmaron por WGS y valorar su capacidad para incorporar y perder fagos Stx.
- Utilizar los caldos de enriquecimiento conservados a -80°C de este proyecto para la búsqueda de las “big six”.
- Utilizar parte de la información obtenida como línea de base para realizar una evaluación de riesgo de STEC en la industria de carne vacuna de Uruguay.
- Realizar estudios similares a este en otros alimentos y/o animales.
- Evaluar si factores de colonización presentes en las cepas STEC analizadas, podrían ser de utilidad para la identificación de antígenos comunes para el diseño y elaboración de vacunas.
- Continuar implementando la WGS para este tipo de cepas, realizando flujos de trabajo claros y estandarizados que puedan ser utilizados por los distintos laboratorios e investigadores que trabajan con STEC.

REFERENCIAS

1. Murray PR. Microbiología médica básica. 1era edición. Estados Unidos: Elsevier Health Sciences; 2018. Capítulo 7.
2. Fiallos López JD, Enriquez M de L, Navarro Ocaña A. Caracterización serológica de *Escherichia coli* en cepas de origen humano. Portal de la Ciencia. 28 de octubre de 2018;(14):41-52. <http://dx.doi.org/10.5377/pc.v0i14.6637>
3. Croxen MA, Law RJ, Scholz R, Keeney KM, Wlodarska M, Finlay BB. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev. 2013 Oct;26(4):822–80.
4. EFSA BIOHAZ Panel, Koutsoumanis K, Allende A, Alvarez-Ordóñez A, Bover-Cid S, et al. Pathogenicity assessment of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and the public health risk posed by contamination of food with STEC. 2020 Jan. EFSA Journal 2020;18(1):5967, 105 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.5967>
5. Jesser KJ, Levy K. Updates on defining and detecting diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes. Curr Opin Infect Dis 2020; 33: 372–380.
6. Caprioli A, Morabito S, Brugère H, Oswald E. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. Vet Res. 2005;36(3):289–311. <http://dx.doi.org/10.1051/vetres:2005002>
7. Breitbart M, Hewson I, Felts B, Mahaffy JM, Nulton J, Salamon P, et al. Metagenomic analyses of an uncultured viral community from human feces. J Bacteriol. 2003 Oct;185(20):6220–3.
8. Murray PR, Kobayashi GS, Pfaller MA. Microbiología médica. 9na edición. España: Elsevier España; 2021. p. 326-30.
9. Farrokh C, Jordan K, Auvray F, Glass K, Oppegaard H, Raynaud S, et al. Review of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and their significance in dairy production. Int J Food Microbiol. 2013 Mar;162(2):190–212.
10. United States Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service. MLG5C.00 “Detection, Isolation and Identification of Top Seven Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STECs) from Meat Products and Carcass and Environmental Sponges” 2019 [Internet]. [cited 2023Mar22]. Available from: https://www.fsis.usda.gov/sites/default/files/media_file/2021-03/mlg-5.pdf
11. United States Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service. MLG5C Appendix 2.00 “Morphologies of Representative Strains from Six non-O157 Shiga ToxinProducing *Escherichia coli* (STEC) Grown on Modified Rainbow Agar” 2019 [Internet]. [cited 2023Mar22]. Available from: https://www.fsis.usda.gov/sites/default/files/media_file/2021-03/mlg-5-appendix-2.pdf.
12. Miliwebsky E, Schelotto F, Varela G, Luz D, Chinen I, Piazza RMF. Human Diarrheal Infections: Diagnosis of Diarrheagenic *Escherichia coli* Pathotypes. In: *Escherichia coli in the Americas*. Cham: Springer International Publishing; 2016. p. 343–69.

13. International Organization for Standardization. ISO/TS 13136:2012 “Microbiology of food and animal feed — Real-time polymerase chain reaction (PCR)-based method for the detection of food-borne pathogens — Horizontal method for the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and the determination of O157, O111, O26, O103 and O145 serogroups”. Geneva: ISO; 2012.
14. EU Reference Laboratory for *E. coli* Department of Food Safety, Nutrition and Veterinary Public Health Unit of Food Microbiology and Foodborne Diseases. Istituto Superiore di Sanità. EURL-VTEC_Method_03_Rev2 “Identification of the STEC serogroups mainly associated with human infections by conventional PCR amplification of O-associated genes” 2020. [Internet]. [cited 2023Mar22]. Available from: https://www.iss.it/documents/5430402/0/EURL-VTEC_Method_03_Rev+2.pdf/c9e031a7-8b92-d52b-2e4a-c5848f9a6c80?t=1619466233273
15. Abdalhamid B, Mccutchen EL, Bouska AC, Weiwei Z, Loeck B, Hinrichs SH, et al. Whole genome sequencing to characterize shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26 in a public health setting. *Journal of Infection and Public Health*. 2019;12(6):884–9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jiph.2019.06.008>
16. Franz E, Delaquis P, Morabito S, Beutin L, Gobius K, Rasko DA, et al. Exploiting the explosion of information associated with whole genome sequencing to tackle Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in global food production systems. *Int J Food Microbiol*. 2014 Sep;187:57–72.
17. Banco de Recursos de Comunicación del Ministerio de Salud de la Nación. Boletín integrado de vigilancia N560 SE30 2021 [Internet]. [cited 2023 Mar 2]. Available from: https://bancos.salud.gov.ar/sites/default/files/2021-09/biv_560_se_30_con_informe_SUH.pdf
18. Vázquez Zeballos S. Caracterización fenotípica y genotípica de cepas de *Escherichia coli* productoras de toxina Shiga (O157 y no-O157) provenientes de alimentos, ganado y casos clínicos. Identificación de nuevos blancos útiles para su detección y control. [Tesis de Doctorado en Biotecnología]. Montevideo, Uruguay: Universidad de la República; 2020.
19. Eymann A, Coccia P, Raddavero C, Lafi G, Ferraris V, Ramírez J, et al. Prevalence and clinical course of typical hemolytic uremic syndrome among sibling. *Arch Argent Pediatr*. 2016 Dec 1;114(6):553–6.
20. European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union One Health 2021 Zoonoses Report. *EFSA J*. 2022 Dec;20(12):e07666.
21. Centers for Disease Control and Prevention. National Enteric Disease Surveillance: Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) Annual Report, 2017. [Internet]. [cited 2023 Mar 1]. Available from: <https://www.cdc.gov/ecoli/surv2017/index.html>
22. Varela G, Chinen I, Gadea P, Miliwebsky E, Mota MI, González S, et al. Detección y caracterización de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga a partir de casos clínicos y de alimentos en Uruguay. *Rev Argent Microbiol*. 2008;40(2):93–100.
23. Etcheverría AI, Padola NL. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: factors involved in virulence and cattle colonization. *Virulence*. 2013 Jul 1;4(5):366–72.
24. Gardette M, Le Hello S, Mariani-Kurkdjian P, Fabre L, Gravey F, Garrivier A, et al. Identification and prevalence of in vivo-induced genes in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Virulence*. 2019 Dec;10(1):180–93.

25. Karpman D, Ståhl A-L. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Pathogenesis and the Host Response. En: Enterohemorrhagic *Escherichia coli* and Other Shiga Toxin-Producing *E. coli*. Washington, DC, USA: ASM Press; 2015. p. 381–402.
26. Deng W, Puente JL, Gruenheid S, Li Y, Vallance BA, Vázquez A, et al. Dissecting virulence: systematic and functional analyses of a pathogenicity island. Proc Natl Acad Sci USA. 2004;101(10):3597–602. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0400326101>
27. Yang X, Sun H, Fan R, Fu S, Zhang J, Matussek A, et al. Genetic diversity of the intimin gene (*eae*) in non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains in China. Sci Rep. 2020 Feb;10(1):3275.
28. Lacher DW, Gangiredla J, Patel I, Elkins CA, Feng PCH. Use of the *Escherichia coli* Identification Microarray for Characterizing the Health Risks of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolated from Foods. J Food Prot. 2016 Oct;79(10):1656–62.
29. Newton HJ. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains negative for locus of enterocyte effacement. Emerg Infect Dis. 2009 Mar;15(3):372–80.
30. Karmali MA, Steele BT, Petric M, Lim C. Sporadic cases of haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. Lancet. 1983 Mar;1(8325):619–20.
31. Paton AW, Srimanote P, Woodrow MC, Paton JC. Characterization of Saa, a novel autoagglutinating adhesin produced by locus of enterocyte effacement-negative Shiga-toxigenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans. Infect Immun. 2001;69(11):6999–7009. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.69.11.6999-7009.2001>
32. Panel on Biological Hazards. Public health risks associated with Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EAEC) as a food-borne pathogen. EFSA J. 2015;13(12). <http://dx.doi.org/10.2903/j.efsa.2015.4330>
33. Herold S, Karch H, Schmidt H. Shiga toxin-encoding bacteriophages--genomes in motion. Int J Med Microbiol. 2004 Sep;294(2-3):115–21.
35. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HLT. Pathogenic *Escherichia coli*. Nat Rev Microbiol. 2004 Feb;2(2):123–40.
36. Tozzoli R, Caprioli A, Morabito S. Detection of *toxB*, a Plasmid Virulence Gene of *Escherichia coli* O157, in Enterohemorrhagic and Enteropathogenic *E. coli*. J Clin Microbiol. 2005 Aug;43(8):4052.
37. Montero DA, Velasco J, Del Canto F, Puente JL, Padola NL, Rasko DA, et al. Locus of Adhesion and Autoaggregation (LAA), a pathogenicity island present in emerging Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* strains. Sci Rep. 2017 Aug 1;7(1):7011.
38. Burgán, J. Tesis doctoral: Estudio de fagos codificantes de toxina Shiga subtipo 2a presentes en aislamientos nativos de *Escherichia coli*. Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Veterinarias. 2019. [Internet]. [cited 2023Mar28]. Available from: <https://www.ridaa.unicen.edu.ar/items/3676cf00-5162-45db-8a84-72fbed574958>
39. Gyles CL. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. J Anim Sci. 2007 Mar;85(13 Suppl):E45–62.

40. Scheutz F, Teel LD, Beutin L, Piérard D, Buvens G, Karch H, et al. Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing Stx nomenclature. *J Clin Microbiol*. 2012 Sep;50(9):2951–63.
41. Joseph A, Cointe A, Mariani Kurkdjian P, Rafat C, Hertig A. Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome: A narrative review. *Toxins (Basel)*. 2020;12(2):67. <http://dx.doi.org/10.3390/toxins12020067>
42. Schüller S. Shiga toxin interaction with human intestinal epithelium. *Toxins (Basel)*. 2011;3(6):626–39. <http://dx.doi.org/10.3390/toxins3060626>
43. Gill A, Dussault F, McMahon T, et al. Characterization of atypical Shiga toxin gene sequences and description of Stx2j, a new subtype. *J Clin Microbiol* 2022; 60: e0222921.
44. Donohue-Rolfe A, Kondova I, Oswald S, Hutto D, Tzipori S. *Escherichia coli* O157:H7 strains that express Shiga toxin (Stx) 2 alone are more neurotropic for gnotobiotic piglets than are isotypes producing only Stx1 or both Stx1 and Stx2. *J Infect Dis*. 2000;181(5):1825–9. <http://dx.doi.org/10.1086/315421>
45. Fuller CA, Pellino CA, Flagler MJ, Strasser JE, Weiss AA. Shiga toxin subtypes display dramatic differences in potency. *Infect Immun*. 2011 Mar;79(3):1329–37.
46. Brüssow H, Canchaya C, Hardt WD. Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2004 Sep;68(3):560–602.
47. Burgán J, Krüger A, Lucchesi PMA. Comparable *stx* expression and phage production levels between Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from human and bovine origin. *Zoonoses Public Health*. 2020 Feb;67(1):44–53.
48. Ogura Y, Ooka T, Iguchi A, Toh H, Asadulghani M, Oshima K, et al. Comparative genomics reveal the mechanism of the parallel evolution of O157 and non-O157 enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009 Oct;106(42):17939–44.
49. Haugum K, Lindstedt B-A, Løbersli I, Kapperud G, Brandal LT. Identification of the anti-terminator qO111:H)- gene in Norwegian sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157:NM. *FEMS Microbiol Lett*. 2012;329(2):102–10. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.2012.02505.x>
50. Wong CS, Jelacic S, Habeeb RL, Watkins SL, Tarr PI. The risk of the hemolytic–uremic syndrome after antibiotic treatment of *Escherichia coli* O157:H7 infections. *N Engl J Med*. 2000;342(26):1930–6. <http://dx.doi.org/10.1056/nejm20000629342260>
51. Kimmitt PT, Harwood CR, Barer MR. Toxin gene expression by shiga toxin-producing *Escherichia coli*: the role of antibiotics and the bacterial SOS response. *Emerg Infect Dis*. 2000;6(5):458–65. <http://dx.doi.org/10.3201/eid0605.000503>
52. Zhang X, McDaniel AD, Wolf LE, Keusch GT, Waldor MK, Acheson DW. Quinolone antibiotics induce Shiga toxin-encoding bacteriophages, toxin production, and death in mice. *J Infect Dis*. 2000;181(2):664–70. <http://dx.doi.org/10.1086/315239>
53. Bai X, Zhao A, Lan R, Xin Y, Xie H, Meng Q, et al. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in yaks (*Bos grunniens*) from the Qinghai-Tibetan Plateau, China. *PLoS One*. 2013 Jun;8(6):e65537.

54. Kastin AJ, editor. Handbook of Biologically Active Peptides. 2da ed. San Diego, CA: Academic Press; 2013. Section II.
55. Liu SM, Miller DM, Roberts RF. Cloning of genes encoding colicin E2 in *Lactococcus lactis* subspecies *lactis* and evaluation of the colicin-producing transformants as inhibitors of *Escherichia coli* O157:H7 during milk fermentation. J Dairy Sci. 2011 Mar;94(3):1146–54.
56. Hinenoya A, Shima K, Asakura M, Nishimura K, Tsukamoto T, Ooka T, et al. Molecular characterization of cytolethal distending toxin gene-positive *Escherichia coli* from healthy cattle and swine in Nara, Japan. BMC Microbiol. 2014 Apr;14:97.
57. Okeke IN, Scaletsky ICA, Soars EH, Macfarlane LR, Torres AG. Molecular epidemiology of the iron utilization genes of enteroaggregative *Escherichia coli*. J Clin Microbiol. 2004;42(1):36–44. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.42.1.36-44.2004>
58. Sarowska J, Futoma-Koloch B, Jama-Kmiecik A, Frej-Madrzak M, Ksiaczek M, Bugla-Ploskonska G, et al. Virulence factors, prevalence and potential transmission of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from different sources: recent reports. Gut Pathog. 2019;11(1):10. <http://dx.doi.org/10.1186/s13099-019-0290-0>
59. Franz E, van Hoek AHAM, Wuite M, van der Wal FJ, de Boer AG, Bouw EI, et al. Molecular hazard identification of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC). PLoS One. 2015 Mar;10(3):e0120353.
60. Dautin N. Serine protease autotransporters of *enterobacteriaceae* (SPATEs): biogenesis and function. Toxins (Basel). 2010;2(6):1179–206. <http://dx.doi.org/10.3390/toxins2061179>
61. Dahan S, Wiles S, La Ragione RM, Best A, Woodward MJ, Stevens MP, et al. EspJ is a prophage-carried type III effector protein of attaching and effacing pathogens that modulates infection dynamics. Infect Immun. 2005 Feb;73(2):679–86.
62. Tobe T. Cytoskeleton-modulating effectors of enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*: role of EspL2 in adherence and an alternative pathway for modulating cytoskeleton through Annexin A2 function: EspL2 effector modulates cytoskeleton. FEBS J. 2010;277(11):2403–8. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1742-4658.2010.07654.x>
63. Burland V, Shao Y, Perna NT, Plunkett G, Sofia HJ, Blattner FR. The complete DNA sequence and analysis of the large virulence plasmid of *Escherichia coli* O157:H7. Nucleic Acids Res. 1998 Sep;26(18):4196-204.
64. Bergholz TM, Tarr CL, Christensen LM, Betting DJ, Whittam TS. Recent gene conversions between duplicated glutamate decarboxylase genes (*gadA* and *gadB*) in pathogenic *Escherichia coli*. Mol Biol Evol. 2007 Oct;24(10):2323–33.
65. Ledesma MA, Ochoa SA, Cruz A, Rocha-Ramírez LM, Mas-Oliva J, Eslava CA, et al. The hemorrhagic coli pilus (HCP) of *Escherichia coli* O157:H7 is an inducer of proinflammatory cytokine secretion in intestinal epithelial cells. PLoS One. 2010 Aug;5(8):e12127.
66. Srinivasan U, Foxman B, Marrs CF. Identification of a gene encoding heat-resistant agglutinin in *Escherichia coli* as a putative virulence factor in urinary tract infection. J Clin Microbiol. 2003 Jan;41(1):285–9.

67. Li Y, Dai J, Zhuge X, Wang H, Hu L, Ren J, et al. Iron-regulated gene *ireA* in avian pathogenic *Escherichia coli* participates in adhesion and stress-resistance. *BMC Vet Res*. 2016 Aug;12(1):167.
68. Biran D, Sura T, Otto A, Yair Y, Becher D, Ron EZ. Surviving Serum: the *Escherichia coli* Gene of Extraintestinal Pathogenic *E. coli* Is Required for the Synthesis of Group 4 Capsule. *Infect Immun*. 2021 Sep;89(10):e0031621.
69. Fu S, Bai X, Fan R, Sun H, Xu Y, Xiong Y. Genetic diversity of the enterohaemolysin gene (*ehxA*) in non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains in China. *Sci Rep*. 2018 Mar;8(1):4233.
70. Brunder W, Schmidt H, Karch H. KatP, a novel catalase-peroxidase encoded by the large plasmid of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Microbiology*. 1996 Nov;142(11):3305–15.
71. Baquero F, Lanza VF, Baquero MR, Del Campo R, Bravo-Vázquez DA. Microcins in *Enterobacteriaceae*: Peptide Antimicrobials in the Eco-Active Intestinal Chemosphere. *Front Microbiol*. 2019 Oct;10:2261.
72. Álvarez RS, Gómez FD, Zotta E, Paton AW, Paton JC, Ibarra C, et al. Combined Action of Shiga Toxin Type 2 and Subtilase Cytotoxin in the Pathogenesis of Hemolytic Uremic Syndrome. *Toxins*. 2021 Jul;13(8). <http://dx.doi.org/10.3390/toxins13080536>
73. Nguyen TTH, Kikuchi T, Tokunaga T, Iyoda S, Iguchi A. Diversity of the Tellurite Resistance Gene Operon in *Escherichia coli*. *Front Microbiol*. 2021 May;12:681175.
74. Rezaei MH, Kakian F, Gholipour A, Zamanzad B. The frequency of PAI, *aer* and *traT* genes in *Escherichia coli* commensal and urinary pathogenic *E. coli* isolates in Shahrekord and the relationship between the two groups by multiplex PCR. *Jundishapur J Microbiol*. 2020;13(6). <http://dx.doi.org/10.5812/jjm.98683>.
75. Montenegro MA, Bitter-Suermann D, Timmis JK, Agüero ME, Cabello FC, Sanyal SC, et al. *traT* gene sequences, serum resistance and pathogenicity-related factors in clinical isolates of *Escherichia coli* and other gram-negative bacteria. *J Gen Microbiol*. 1985;131(6):1511–21. <http://dx.doi.org/10.1099/00221287-131-6-1511>
76. Yin S, Jensen MA, Bai J, Debroy C, Barrangou R, Dudley EG. The evolutionary divergence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* is reflected in clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) spacer composition. *Appl Environ Microbiol*. 2013 Sep;79(18):5710–20.
77. Galarce N, Sánchez F, Fuenzalida V, Ramos R, Escobar B, Lapierre L, et al. Phenotypic and Genotypic Antimicrobial Resistance in Non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolated From Cattle and Swine in Chile. *Front Vet Sci*. 2020 Jul;7:367.
78. Mir RA, Kudva IT. Antibiotic-resistant Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: An overview of prevalence and intervention strategies. *Zoonoses Public Health*. 2019;66(1):1–13. <http://dx.doi.org/10.1111/zph.12533>
79. Lapierre L, Toro C, San Martín B. Estudio de la resistencia a antimicrobianos en cepas de *Enterococcus* spp, aisladas de aves y cerdos de producción. *Av Cienc Vet*. 2012;25(1–2). <http://dx.doi.org/10.5354/0716-260x.2010.18284>

80. Food and Agriculture Organization, World Health Organization. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and food: Attribution, characterization and monitoring. Genève, Switzerland: World Health Organization; 2019.
81. FOODBORNE DISEASE BURDEN EPIDEMIOLOGY REFERENCE GROUP 2007-2015. Who estimates of the global burden of foodborne diseases. Who.int. [Internet]. [cited 2023 Apr 7]. Available from: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/199350/9789241565165_eng.pdf?sequence=1
82. Majowicz SE, Scallan E, Jones-Bitton A, Sargeant JM, Stapleton J, Angulo FJ, et al. Global incidence of human Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections and deaths: a systematic review and knowledge synthesis. Foodborne Pathog Dis. 2014 Jun;11(6):447–55.
83. Kirk MD, Pires SM, Black RE, Caipo M, Crump JA, Devleeschauwer B, et al. Correction: World Health Organization Estimates of the Global and Regional Disease Burden of 22 Foodborne Bacterial, Protozoal, and Viral Diseases, 2010: A Data Synthesis. PLoS Med. 2015 Dec;12(12):e1001940.
84. Tack DM, Marder EP, Griffin PM, Cieslak PR, Dunn J, Hurd S, et al. Preliminary Incidence and Trends of Infections with Pathogens Transmitted Commonly Through Food - Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 U.S. Sites, 2015-2018. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2019 Apr 26;68(16):369–73.
85. Vally H, Hall G, Dyda A, Raupach J, Knope K, Combs B, et al. Epidemiology of Shiga toxin producing *Escherichia coli* in Australia, 2000-2010. BMC Public Health. 2012 Jan;12:63.
86. European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control (EFSA and ECDC). The European Union One Health 2018 Zoonoses Report. EFSA J. 2019 Dec;17(12):e05926.
87. Feng J, Xu K, Shi X, Xu L, Liu L, Wang F, et al. Incidence and cost of haemolytic uraemic syndrome in urban China: a national population-based analysis. BMC Nephrol. 2022 Mar;23(1):122.
88. Ministerio de Salud Argentina, Dirección de Epidemiología. Boletín epidemiológico Nacional N611 SE29 2022 [Internet]. [cited 2023 Mar 28]. Available from: <https://bancos.salud.gob.ar/sites/default/files/2022-07/BEN-611-SE-29.pdf>
89. Torres AG, Amaral MM, Bentancor L, Galli L, Goldstein J, Krüger A, et al. Recent Advances in Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Research in Latin America. Microorganisms. 2018;6(4). Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms6040100>
90. Attributing illness caused by Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) to specific foods: report [Internet]. Who.int. World Health Organization; 2019 [cited 2023 Mar 28]. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241516396>
91. Baranzoni GM, Fratamico PM, Reichenberger ER, Kim GH, Breidt F, Kay K, et al. Complete Genome Sequences of *Escherichia coli* O157:H7 Strains SRCC 1675 and 28RC, Which Vary in Acid Resistance. Genome Announc. 2016 Jul;4(4). <http://dx.doi.org/10.1128/genomeA.00743-16>
92. Chilena A, Calidad L, Alimentaria I, Di F, Mv PS, Sotomayor G, et al. *Escherichia coli* productoras de toxinas Shiga O157 y No. Gob.cl. 2018. [Internet] [cited 2023 Mar 28]. Available from: <https://www.achipia.gob.cl/wp-content/uploads/2018/06/Perfil-de-Riesgo-E-coli-STEC-en-carne-bovina-v1-2018-1.pdf>

93. Etcheverría A, Padola N. Síndrome Urémico Hemolítico. El rol del bovino como reservorio de *Escherichia coli* productores de verocitotoxinas (VTEC). Archivos latinoamericano de Nefrología Pediátrica. 2013. [Internet] [cited 2023 Mar 28]. Available from: https://www.researchgate.net/publication/263617338_SINDROME_UREMICO_HEMOLITICO_EL_ROL_DEL_BOVINO_COMO_RESERVORIO_DE_ESCHERICHIA_COLI_PRODUCTORES_DE_VEROCITOTOXINAS_VTEC
94. Persad AK, LeJeune JT. Animal Reservoirs of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. In: Enterohemorrhagic *Escherichia coli* and Other Shiga Toxin-Producing *E coli*. Washington, DC, USA: ASM Press; 2015. p. 211–30.
95. Fegan N, Vanderlinde P, Higgs G, Desmarchelier P. The prevalence and concentration of *Escherichia coli* O157 in faeces of cattle from different production systems at slaughter. J Appl Microbiol. 2004;97(2):362–70. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02300.x>
96. Croxen MA, Law RJ, Scholz R, Keeney KM, Wlodarska M, Finlay BB. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev. 2013 Oct;26(4):822–80. <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.00022-13>
97. Bosilevac JM, Gassem MA, Al Sheddy IA, Almaiman SA, Al-Mohizea IS, Alowaimer A, et al. Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* in camels, cattle, goats, and sheep harvested for meat in Riyadh. J Food Prot. 2015 Jan;78(1):89–96.
98. Brusa V, Costa M, Padola NL, Etcheverría A, Sampedro F, Fernandez PS, et al. Quantitative risk assessment of haemolytic uremic syndrome associated with beef consumption in Argentina. PLoS One. 2020 Nov;15(11):e0242317.
99. Barkocy-Gallagher GA, Arthur TM, Rivera-Betancourt M, Nou X, Shackelford SD, Wheeler TL, et al. Seasonal prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, including O157:H7 and non-O157 serotypes, and *Salmonella* in commercial beef processing plants. J Food Prot. 2003 Nov;66(11):1978–86.
100. Brichta-Harhay DM, Arthur TM, Bosilevac JM, Guerini MN, Kalchayanand N, Koohmaraie M. Enumeration of *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef, cattle carcass, hide and faecal samples using direct plating methods. J Appl Microbiol. 2007 Nov;103(5):1657–68.
101. SISTEMA DE ANÁLISIS DE PELIGROS Y DE PUNTOS CRÍTICOS DE CONTROL (HACCP) Y DIRECTRICES PARA SU APLICACIÓN [Internet]. Fao.org. [cited 2023 Apr 7]. Available from: <https://www.fao.org/3/y1579s/y1579s03.htm>
102. Martorelli L, Hovde CJ, Vilte DA, Albanese A, Zotta E, Ibarra C, et al. Impact of infection dose and previous serum antibodies against the locus of enterocyte effacement proteins on *Escherichia coli* O157:H7 shedding in calves following experimental infection. Biomed Res Int. 2015 Jun;2015:290679. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/290679>
103. Aen A F. Anuario 2021. Inac.uy. [Internet] [cited 2023 Mar 28]. Available from: https://www.inac.uy/innovaportal/file/21909/1/inac_anuario_2021.pdf
104. Consumo, Informe 2021. Inac.uy [Internet] [cited 2023 Mar 28]. Available from: <https://www.inac.uy/innovaportal/v/18275/1/innova.front/consumo>

105. Delbono: UV. INIA [Internet]. [cited 2023 Feb 28]. Available from: <http://www.inia.org.uy/online/site/3158381.php>
106. Bovinos. Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. [Internet] [cited 2023 Mar 1]. Available from: <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/bovinos>
107. RASFF WINDOW [Internet]. [cited 2023 Mar 1]. Available from: <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/screen/search>
108. Masana MO, D'astek BA, Palladino PM, Galli L, Del Castillo LL, Carbonari C, et al. Genotypic characterization of non-O157 shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef abattoirs of Argentina. *J Food Prot.* 2011 Dic;74(12):2008–17. <http://dx.doi.org/10.4315/0362-028x.jfp-11-189>
109. Brusa V, Restovich V, Galli L, Teitelbaum D, Signorini M, Brasesco H, et al. Isolation and characterization of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from beef carcasses, cuts and trimmings of abattoirs in Argentina. *PLoS One.* 2017;12(8):e0183248. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0183248>
110. Paton AW, Paton JC. Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli hlyA*, *rfbO111*, and *rfbO157*. *J Clin Microbiol.* 1998;36(2):598–602. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.36.2.598-602.1998>
111. Clinical and Laboratory Standards Institute. Springer Reference Medizin. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2019. p.604
112. Clinical and Laboratory Standards Institute. Springer Reference Medizin. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2020.
113. Mic N, Neg M, Mdr Mic N. MicroScan GRAM–NEGATIVE MIC PANELS [Internet]. Beckmancoulter.com. [cited 2023 Apr 12]. Available from: <https://media.beckmancoulter.com/-/media/diagnostics/products/microbiology/conventional-panels/docs/microscan-gram-neg-and-pos-panel-ous.pdf>
114. Peirano V, Bianco MN, Navarro A, Schelotto F, Varela G. Diarrheagenic *Escherichia coli* associated with acute gastroenteritis in children from Soriano, Uruguay. *Can J Infect Dis Med Microbiol.* 2018;2018:8387218. <http://dx.doi.org/10.1155/2018/8387218>
115. Andrews S. FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data. 2010. <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
116. Joshi NA, Fass JN. Sickle: A sliding-window, adaptive, quality-based trimming tool for FastQ files. 2011. (Version 1.21) [Software]. Available at <https://github.com/najoshi/sickle>.
117. Zerbino DR, Birney E. Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome Res.* 2008;18(5):821–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1101/gr.074492.107>
118. Bortolaia V, Kaas RS, Ruppe E, Roberts MC, Schwarz S, Cattoir V, et al. ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. *J Antimicrob Chemother.* 2020;75(12):3491–500. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkaa345>

119. Camacho C, Coulouris G, Avagyan V, Ma N, Papadopoulos J, Bealer K, et al. BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics*. 2009;10(1):421. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2105-10-421>
120. Joensen KG, Scheutz F, Lund O, Hasman H, Kaas RS, Nielsen EM, et al. Real-time whole-genome sequencing for routine typing, surveillance, and outbreak detection of verotoxigenic *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol*. 2014;52(5):1501–10. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.03617-13>
121. Zankari E, Allesøe R, Joensen KG, Cavaco LM, Lund O, Aarestrup FM. PointFinder: a novel web tool for WGS-based detection of antimicrobial resistance associated with chromosomal point mutations in bacterial pathogens. *J Antimicrob Chemother*. 2017;72(10):2764–8. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkx217>
122. Slater GSC, Birney E. Automated generation of heuristics for biological sequence comparison. *BMC Bioinformatics*. 2005;6:31. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2105-6-31>
123. Toxins S. Identification of the subtypes of Shigatoxin encoding genes (*stx*) of *Escherichia coli* by conventional PCR [Internet]. Iss.it. [cited 2023 Apr 15]. Available from: https://www.iss.it/documents/5430402/0/EURL-VTEC_Method_06_Rev+2.pdf/20226358-3792-de68-2f24-1f0249466e0e?t=1619466269431
124. Aim 1. Detection of Enteroaggregative *Escherichia coli* in food by Real Time PCR amplification of the *aggR* and *aaiC* genes [Internet]. Iss.it. [cited 2023 Apr 15]. Available from: https://www.iss.it/documents/5430402/0/EURL-VTEC_Method_05_Rev+2.pdf/594488e7-64d9-1344-5013-9d835be12248?t=1619466257164
125. Bai X, Zhao A, Lan R, Xin Y, Xie H, Meng Q, et al. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in yaks (*Bos grunniens*) from the Qinghai-Tibetan Plateau, China. *PLoS One*. 2013;8(6):e65537. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0065537>
126. Montero DA, Velasco J, Del Canto F, Puente JL, Padola NL, Rasko DA, et al. Locus of Adhesion and Autoaggregation (LAA), a pathogenicity island present in emerging Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* strains. *Sci Rep*. 2017;7(1):7011. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-06999-y>
127. Wang Y, Tang C, Yu X, Xia M, Yue H. Distribution of serotypes and virulence-associated genes in pathogenic *Escherichia coli* isolated from ducks. *Avian Pathol*. 2010;39(4):297–302. <http://dx.doi.org/10.1080/03079457.2010.495742>
128. Paton AW, Paton JC. Direct Detection and Characterization of Shiga Toxigenic *Escherichia coli* by Multiplex PCR for *stx*₁, *stx*₂, *eae*, *ehxA*, and *saa*. *Journal of Clinical Microbiology*. 2002;40(1):271–4. <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.40.1.271-274.2002>
129. Herold S, Paton JC, Paton AW. Sab, a novel autotransporter of locus of enterocyte effacement-negative shiga-toxigenic *Escherichia coli* O113:H21, contributes to adherence and biofilm formation. *Infect Immun*. 2009;77(8):3234–43. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.00031-09>
130. Franz E, van Hoek AHAM, Wuite M, van der Wal FJ, de Boer AG, Bouw EI, et al. Molecular hazard identification of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC). *PLoS One*. 2015;10(3):e0120353. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0120353>

131. Larsen MV, Cosentino S, Rasmussen S, Friis C, Hasman H, Marvig RL, et al. Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria. *J Clin Microbiol.* 2012;50(4):1355–61. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.06094-11>
132. Clausen PTL, Aarestrup FM, Lund O. Rapid and precise alignment of raw reads against redundant databases with KMA. *BMC Bioinformatics.* 2018;19(1):307. <http://dx.doi.org/10.1186/s12859-018-2336-6>
133. Zhou Z, Alikhan N-F, Mohamed K, Fan Y, Agama Study Group, Achtman M. The Enterobase user's guide, with case studies on *Salmonella* transmissions, *Yersinia pestis* phylogeny, and *Escherichia* core genomic diversity. *Genome Res.* 2020;30(1):138–52. <http://dx.doi.org/10.1101/gr.251678.119>
134. Joensen KG, Tetzschner AM, Iguchi A, Aarestrup FM, Scheutz F. Rapid and easy in silico serotyping of *Escherichia coli* isolates by use of whole-genome sequencing data. *J Clin Microbiol.* 2015;53(8):2410–26. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00008-15>
135. Arndt D, Grant JR, Marcu A, Sajed T, Pon A, Liang Y, et al. PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(W1):W16–21. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkw387>
136. Zhou Y, Liang Y, Lynch KH, Dennis JJ, Wishart DS. PHAST: a fast phage search tool. *Nucleic Acids Res.* 2011;39:W347–52. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkr485>
137. Carattoli A, Zankari E, García-Fernández A, Voldby Larsen M, Lund O, Villa L, et al. In silico detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(7):3895–903. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.02412-14>
138. Beghain J, Bridier-Nahmias A, Le Nagard H, Denamur E, Clermont O. ClermonTyping: an easy-to-use and accurate in silico method for *Escherichia* genus strain phylotyping. *Microb Genom.* 2018;4(7). <http://dx.doi.org/10.1099/mgen.0.000192>
139. Clermont O, Dixit OVA, Vangchhia B, Condamine B, Dion S, Bridier-Nahmias A, et al. Characterization and rapid identification of phylogroup G in *Escherichia coli*, a lineage with high virulence and antibiotic resistance potential. *Environ Microbiol.* 2019;21(8):3107–17. <http://dx.doi.org/10.1111/1462-2920.14713>
140. Page AJ, Cummins CA, Hunt M, Wong VK, Reuter S, Holden MTG, et al. Roary: rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. *Bioinformatics.* 2015;31(22):3691–3. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btv421>
141. Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics.* 2014;30(14):2068–9. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153>
142. Cuccuru G, Orsini M, Pinna A, Sbardellati A, Soranzo N, Travaglione A, et al. Orione, a web-based framework for NGS analysis in microbiology. *Bioinformatics.* 2014;30(13):1928–9. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btu135>
143. Cortimiglia C, Borney MF, Bassi D, Cocconcilli PS. Genomic investigation of virulence potential in shiga toxin *Escherichia coli* (STEC) strains from a semi-hard raw milk cheese. *Front Microbiol.* 2020;11:629189. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2020.629189>

144. Stamatakis A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*. 2014;30(9):1312–3. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btu033>
145. Knijn A, Michelacci V, Orsini M, Morabito S. Advanced Research Infrastructure for Experimentation in genomicS (ARIES): a lustrum of Galaxy experience [Internet]. *bioRxiv*. 2020. Available from: <http://dx.doi.org/10.1101/2020.05.14.095901>
146. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol*. 2012;19(5):455–77. <http://dx.doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>
147. Programa. “INNUca: INNUENDO quality control of reads, de novo assembly and contigs quality assessment, and possible contamination search”. <https://github.com/B-UMMI/INNUca> [Accessed 14 April 2023].
148. Scheutz F, Teel LD, Beutin L, Piérard D, Buvens G, Karch H, et al. Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing Stx nomenclature. *J Clin Microbiol*. 2012;50(9):2951–63. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00860-12>
149. Feijao P, Yao H-T, Fornika D, Gardy J, Hsiao W, Chauve C, et al. MentaLiST - A fast MLST caller for large MLST schemes. *Microb Genom*. 2018;4(2). <http://dx.doi.org/10.1099/mgen.0.000146>
150. Zhou Z, Alikhan N-F, Mohamed K, Fan Y, Achtman M, the Agama Study Group. The user’s guide to comparative genomics with Enterobase, including case studies on transmissions of micro-clades of *Salmonella*, the phylogeny of ancient and modern *Yersinia pestis* genomes, and the core genomic diversity of all *Escherichia*. *bioRxiv*. 2019. <http://dx.doi.org/10.1101/613554>
151. Feldgarden M, Brover V, Haft DH, Prasad AB, Slotta DJ, Tolstoy I, et al. Erratum for feldgarden et al., “validating the AMRFinder tool and resistance gene database by using antimicrobial resistance genotype-phenotype correlations in a collection of isolates.” *Antimicrob Agents Chemother*. 2020;64(4). <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00361-20>
152. Programa. “patho_typing: *In silico* pathogenic typing directly from raw Illumina reads” https://github.com/B-UMMI/patho_typing [Accessed 14 April 2023].
153. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 2014;30(15):2114–20. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
154. Suvorov A, Agarwala R, Lipman DJ. SKESA: strategic k-mer extension for scrupulous assemblies. *Genome Biol*. 2018;19(1):153. <http://dx.doi.org/10.1186/s13059-018-1540-z>
155. Nurk S, Meleshko D, Korobeynikov A, Pevzner PA. metaSPAdes: a new versatile metagenomic assembler. *Genome Res* [Internet]. 2017;27(5):824–34. Available from: <http://dx.doi.org/10.1101/gr.213959.11601/gr.213959.116>
156. Programa. “Seemann T. shovill: ♠ Assemble bacterial isolate genomes from Illumina paired-end reads”. <https://github.com/tseemann/shovill> [Accessed 30 April 2020].
157. Li H. Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM. *arXiv:13033997 [q-bio]*. 2013. Available at: <http://arxiv.org/abs/1303.3997> [Accessed 7 April 2020]

158. Langmead B, Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods*. 2012;9(4):357–9. <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.1923>
159. Mirdita M, Steinegger M, Söding J. MMseqs2 desktop and local web server app for fast, interactive sequence searches. *Bioinformatics*. 2019;35(16):2856–8. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/bty1057>
160. Buchfink B, Xie C, Huson DH. Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. *Nat Methods*. 2015;12(1):59–60. <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.3176>
161. Katoh K, Standley DM. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol Biol Evol*. 2013;30(4):772–80. <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/mst010>
162. Kurtz S, Phillippy A, Delcher AL, Smoot M, Shumway M, Antonescu C, et al. Versatile and open software for comparing large genomes. *Genome Biol*. 2004;5(2):R12. <http://dx.doi.org/10.1186/gb-2004-5-2-r12>
163. Gurevich A, Saveliev V, Vyahhi N, Tesler G. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*. 2013;29(8):1072–5. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btt086>
164. Lees JA, Harris SR, Tonkin-Hill G, Gladstone RA, Lo SW, Weiser JN, et al. Fast and flexible bacterial genomic epidemiology with PopPUNK. *Genome Res [Internet]*. 2019;29:304–16. Available from: <http://dx.doi.org/10.1101/gr.241455.118>
165. Gardner SN, Slezak T, Hall BG. kSNP3.0: SNP detection and phylogenetic analysis of genomes without genome alignment or reference genome: Table 1. *Bioinformatics*. 2015. p. 2877–8. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btv271>
166. Davis S, Pettengill JB, Luo Y, Payne J, Shpuntoff A, Rand H, et al. CFSAN SNP Pipeline: an automated method for constructing SNP matrices from next-generation sequence data. *PeerJ Comput Sci*. 2015;1:e20. <http://dx.doi.org/10.7717/peerj-cs.20>
167. Ronquist F, Teslenko M, van der Mark P, Ayres DL, Darling A, Höhna S, et al. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Syst Biol*. 2012;61:539–42. <http://dx.doi.org/10.1093/sysbio/sys029>
168. Guindon S, Dufayard J-F, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst Biol*. 2010;59:307–21. <http://dx.doi.org/10.1093/sysbio/syq010>
169. Minh BQ, Schmidt HA, Chernomor O, Schrempf D, Woodhams MD, von Haeseler A, et al. IQ-TREE 2: New Models and Efficient Methods for Phylogenetic Inference in the Genomic Era. *Molecular Biology and Evolution*. 2020. p. 1530–4. <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msaa015>
170. Inouye M, Dashnow H, Raven L-A, Schultz MB, Pope BJ, Tomita T, et al. SRST2: Rapid genomic surveillance for public health and hospital microbiology labs. *Genome Med*. 2014;6:90. <http://dx.doi.org/10.1186/s13073-014-0090-6>
171. Programa. Seemann T. “mlst: Scan contig files against PubMLST typing schemes”. <https://github.com/tseemann/mlst> [Accessed 30 April 2020].

172. Silva M, Machado MP, Silva DN, Rossi M, Moran-Gilad J, Santos S, et al. chewBBACA: A complete suite for gene-by-gene schema creation and strain identification. *Microb Genom.* 2018;4(3). <http://dx.doi.org/10.1099/mgen.0.000166>
173. Feldgarden M, Brover V, Haft DH, Prasad AB, Slotta DJ, Tolstoy I, et al. Validating the AMRFinder Tool and Resistance Gene Database by Using Antimicrobial Resistance Genotype-Phenotype Correlations in a Collection of Isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2019;63. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00483-19>
174. Alcock BP, Raphenya AR, Lau TTY, Tsang KK, Bouchard M, Edalatmand A, et al. CARD 2020: antibiotic resistome surveillance with the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic Acids Res [Internet].* 2020;48:D517–25. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkz935>
175. Zhou Z, Alikhan N-F, Sergeant MJ, Luhmann N, Vaz C, Francisco AP, et al. GrapeTree: visualization of core genomic relationships among 100,000 bacterial pathogens. *Genome Res.* 2018;28:1395–404. <http://dx.doi.org/10.1101/gr.232397.117>
176. Doméstico M. Prices and Values [Internet]. Inac.uy. [cited 2023 Apr 16]. Available from: https://www.inac.uy/innovaportal/file/18260/1/inac_anuario2019_digital-h-2.pdf
177. Clinical and Laboratory Standards Institute. Springer Reference Medizin. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2015.
178. ATAC-seq : Raw read quality control - FastQC. Workshop ChIPATAC 2020. [cited 2023 Apr 17]. Available from: https://www.hdsu.org/chipatac2020/02_ATAC_ReadQC.html
179. Lindsey RL, Pouseele H, Chen JC, et al. Implementation of whole genome sequencing (WGS) for identification and characterization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in the United States. *Front Microbiol* 2016; 7: 766. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2016.00766>
180. Llarena A-K, Ribeiro-Gonçalves BF, Nuno Silva D, et al. INNUENDO: A cross-sectoral platform for the integration of genomics in the surveillance of food-borne pathogens. *EFSA Support Publ*; 15. Epub ahead of print 2018. DOI: 10.2903/sp.efsa.2018.en-1498. <http://dx.doi.org/10.2903/sp.efsa.2018.en-1498>
181. Monaghan A, Byrne B, Fanning S, Sweeney T, McDowell D, Bolton DJ. Serotypes and virulotypes of non-O157 shiga-toxin producing *Escherichia coli* (STEC) on bovine hides and carcasses. *Food Microbiol.* 2012 Dec;32(2):223–9.
182. Cobbold RN, Davis MA, Rice DH, Szymanski M, Tarr PI, Besser TE, et al. Associations between bovine, human, and raw milk, and beef isolates of non-O157 Shiga toxigenic *Escherichia coli* within a restricted geographic area of the United States. *J Food Prot.* 2008 May;71(5):1023–7.
183. Stromberg ZR, Baumann NW, Lewis GL, Sevart NJ, Cernicchiaro N, Renter DG, et al. Prevalence of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26, O45, O103, O111, O121, O145, and O157 on Hides and Preintervention Carcass Surfaces of Feedlot Cattle at Harvest. *Foodborne Pathog Dis.* 2015 Jul;12(7):631–8.
184. Cobbold RN, Rice DH, Szymanski M, et al. Comparison of shiga-toxigenic *Escherichia coli* prevalences among dairy, feedlot, and cow-calf herds in Washington State. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70: 4375–4378.

185. Senthakumaran T, Brandal LT, Lindstedt B-A, Jørgensen SB, Charnock C, Tunsjø HS. Implications of *stx* loss for clinical diagnostics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2018; 37: 2361–70. <http://dx.doi.org/10.1007/s10096-018-3384-6>
186. Arthur TM, Barkocy-Gallagher GA, Rivera-Betancourt M, Koohmaraie M. Prevalence and characterization of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* on carcasses in commercial beef cattle processing plants. *Appl Environ Microbiol*. 2002 Oct;68(10):4847–52.
187. Castro VS, Ortega Polo R, Figueiredo EE de S, Bumunange EW, McAllister T, King R, et al. Inconsistent PCR detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: Insights from whole genome sequence analyses. *PLoS One*. 2021 Sep 3;16(9):e0257168.
188. Karch H, Meyer T, Rüssmann H, et al. Frequent loss of Shiga-like toxin genes in clinical isolates of *Escherichia coli* upon subcultivation. *Infect Immun* 1992; 60: 3464–3467
189. Macori G, McCarthy SC, Burgess CM, et al. Investigation of the causes of shigatoxigenic *Escherichia coli* PCR positive and culture negative samples. *Microorganisms*; 8. Epub ahead of print 2020. DOI: 10.3390/microorganisms8040587.
190. Grotiuz G, Sirok A, Gadea P, et al. Shiga toxin 2-producing *Acinetobacter haemolyticus* associated with a case of bloody diarrhea. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 3838–3841.
191. Bielaszewska M, Prager R, Köck R, et al. Shiga toxin gene loss and transfer in vitro and in vivo during enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26 infection in humans. *Appl Environ Microbiol* 2007; 73: 3144–3150.
192. Barkocy-Gallagher GA, Arthur TM, Rivera-Betancourt M, et al. Seasonal prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, including O157:H7 and non-O157 serotypes, and *Salmonella* in commercial beef processing plants. *J Food Prot* 2003; 66: 1978–1986.
193. Ballem A, Gonçalves S, Garcia-Meniño I, et al. Prevalence and serotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in dairy cattle from Northern Portugal. *PLoS One* 2020; 15: e0244713.
194. Rhades L. *Trasmisión y persistencia de E. coli O157:H7 en bovinos*. Universidad Tecnológica Nacional, 2017. Rosario, Argentina.
195. Signorini M, Costa M, Teitelbaum D, et al. Evaluation of decontamination efficacy of commonly used antimicrobial interventions for beef carcasses against Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Meat Sci* 2018; 142: 44–51.
196. Brichta-Harhay DM, Arthur TM, Bosilevac JM, et al. Enumeration of *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef, cattle carcass, hide and faecal samples using direct plating methods: HGMF and SPCM enumeration methods. *J Appl Microbiol* 2007; 103: 1657–1668.
197. Smith RP, Paiba GA, Ellis-Iversen J. Longitudinal study to investigate VTEC O157 shedding patterns in young cattle. *Res Vet Sci* 2010; 88: 411–414.
198. Varela-Hernández JJ, Cabrera-Díaz E, Cardona-López MA, et al. Isolation and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 and non-O157 from beef carcasses at a slaughter plant in Mexico. *Int J Food Microbiol* 2007; 113: 237–241.

199. Carney E, O'Brien SB, Sheridan JJ, et al. Prevalence and level of *Escherichia coli* O157 on beef trimmings, carcasses and boned head meat at a beef slaughter plant. *Food Microbiol* 2006; 23: 52–59.
200. Gun H, Yilmaz A, Turker S, Tanlasi A, Yilmaz H. Contamination of bovine carcasses and abattoir environment by *Escherichia coli* O157:H7 in Istanbul. *Int J Food Microbiol*. 2003 Aug 1;84(3):339–44.
201. Abdissa R, Haile W, Fite AT, Beyi AF, Agga GE, Edao BM, et al. Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in beef cattle at slaughter and beef carcasses at retail shops in Ethiopia. *BMC Infect Dis*. 2017 Apr 17;17(1):277.
202. Masana MO, D'Astek BA, Palladino PM, Galli L, Del Castillo LL, Carbonari C, et al. Genotypic characterization of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef abattoirs of Argentina. *J Food Prot*. 2011 Dec;74(12):2008–17.
203. Karch H, Bielaszewska M. Sorbitol-fermenting Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H(-) strains: epidemiology, phenotypic and molecular characteristics, and microbiological diagnosis. *J Clin Microbiol*. 2001 Jun;39(6):2043–9.
204. Iguchi A, Iyoda S, Seto K, Morita-Ishihara T, Scheutz F, Ohnishi M, et al. *Escherichia coli* O-Genotyping PCR: a Comprehensive and Practical Platform for Molecular O Serogrouping. *J Clin Microbiol*. 2015 Aug;53(8):2427–32.
206. Cap M, Carbonari CC, D'Astek BA, Zolezzi G, Deza N, Palladino MP, et al. Frequency, characterization and genotypic analysis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef slaughterhouses of Argentina. *Rev Argent Microbiol*. 2019 Jan-Mar;51(1):32–8.
207. Torres A, Amaral M, Bentancor L, et al. Recent Advances in Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Research in Latin America. *Microorganisms* 2018; 6: 100. <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms6040100>
208. Oliveira MG, Brito JRF, Gomes TAT, Guth BEC, Vieira MAM, Naves ZVF, et al. Diversity of virulence profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes in food-producing animals in Brazil. *Int J Food Microbiol*. 2008 Sep 30;127(1-2):139–46.
209. Santos ECCD, Castro VS, Cunha-Neto A, et al. *Escherichia coli* O26 and O113:H21 on carcasses and beef from a slaughterhouse located in Mato Grosso, Brazil. *Foodborne Pathog Dis* 2018; 15: 653–659. <http://dx.doi.org/10.1089/fpd.2018.2431>
210. Gonzalez AGM, Cerqueira AMF, Guth BEC, Coutinho CA, Liberal MHT, Souza RM, et al. Serotypes, virulence markers and cell invasion ability of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from healthy dairy cattle. *J Appl Microbiol*. 2016 Oct;121(4):1130–43.
211. Bosilevac JM, Koohmaraie M. Prevalence and characterization of non-O157 shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from commercial ground beef in the United States. *Appl Environ Microbiol*. 2011 Mar;77(6):2103–12.
212. Bettelheim KA, Goldwater PN. Serotypes of Non-O157 Shigatoxigenic *Escherichia coli* (STEC). *Adv Microbiol*. 2014;04(07):377–89.
213. EFSA BIOHAZ Panel, Koutsoumanis K, Allende A, et al. Pathogenicity assessment of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and the public health risk posed by contamination of food with STEC. *EFSA J*; 18. Epub ahead of print 2020. DOI: 10.2903/j.efsa.2020.5967.

214. World Health Organization, Food and Agriculture Organization of the United Nations. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and food: attribution, characterization, and monitoring: report. World Health Organization; 2018.
215. LaPlante KL, Dhand A, Wright K, et al. Re-establishing the utility of tetracycline-class antibiotics for current challenges with antibiotic resistance. *Ann Med* 2022; 54: 1686–1700.
216. Grossman TH. Tetracycline antibiotics and resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2016; 6: a025387.
217. Galarce N, Sánchez F, Escobar B, et al. Genomic epidemiology of shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from the livestock-food-human interface in South America. *Animals (Basel)* 2021; 11: 1845.
218. Ahmed AM, Shimamoto T. Molecular analysis of multidrug resistance in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 isolated from meat and dairy products. *Int J Food Microbiol* 2015; 193: 68–73.
219. Balbin MM, Hull D, Guest C, et al. Antimicrobial resistance and virulence factors profile of *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* isolated from different environments exposed to anthropogenic activity. *J Glob Antimicrob Resist* 2020; 22: 578–583.
220. Umpiérrez A, Ernst D, Cardozo A, Torres A, Fernández M, Fraga M, et al. Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* with potential harmful profiles to humans are isolated from the faeces of calves in Uruguay. *Austral j vet sci.* 2022;54(2):45–53.
221. Tegha G, Ciccone EJ, Krysiak R, et al. Genomic epidemiology of *Escherichia coli* isolates from a tertiary referral center in Lilongwe, Malawi. *Microb Genom*; 7. Epub ahead of print 2021. DOI: 10.1099/mgen.0.000490.
222. Costa M, Londero A, Brusa V, et al. Characterization and molecular subtyping of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains in provincial abattoirs from the Province of Buenos Aires, Argentina, during 2016-2018. *Prev Vet Med* 2020; 183: 105133.
223. Basu D, Tumer NE. Do the A subunits contribute to the differences in the toxicity of Shiga toxin 1 and Shiga toxin 2? *Toxins (Basel)* 2015; 7: 1467–1485. <http://dx.doi.org/10.3390/toxins7051467>
224. Yang X, Sun H, Fan R, Fu S, Zhang J, Matussek A, et al. Genetic diversity of the intimin gene (eae) in non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains in China. *Sci Rep.* 2020 Feb 24;10(1):3275.
225. Hua Y, Bai X, Zhang J, Jernberg C, Chromek M, Hansson S, et al. Molecular characteristics of -positive clinical Shiga toxin-producing in Sweden. *Emerg Microbes Infect.* 2020 Dec;9(1):2562–70.
226. Pérez L, Apezteguía L, Piñeyría C, Dabezies A, Bianco MN, Schelotto F, et al. Hemolytic uremic syndrome with mild renal involvement due to Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) O145 strain. *Rev Argent Microbiol.* 2014 Apr-Jun;46(2):103–6.
227. Jores J, Zehmke K, Eichberg J, Rumer L, Wieler LH. Description of a novel intimin variant (type zeta) in the bovine O84:NM verotoxin-producing *Escherichia coli* strain 537/89 and the diagnostic value of intimin typing. *Exp Biol Med.* 2003 Apr;228(4):370–6.

228. Torti JF, Cuervo P, Nardello A, et al. Epidemiology and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* of hemolytic uremic syndrome in Argentina. *Cureus* 2021; 13: e17213.
229. Carbonari CC, Ricciardi M, Calvo AR, et al. An Stx-EAEC O59:NM[H19] strain isolated from a hemolytic uremic syndrome case in Argentina. *Rev Argent Microbiol* 2020; 52: 31–35.
230. Galarce N, Escobar B, Sánchez F, et al. Virulence genes, Shiga toxin subtypes, serogroups, and clonal relationship of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from livestock and companion animals. *Animals (Basel)* 2019; 9: 733.
231. Cergole-Novella MC, Nishimura LS, Dos Santos LF, et al. Distribution of virulence profiles related to new toxins and putative adhesins in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from diverse sources in Brazil. *FEMS Microbiol Lett* 2007; 274: 329–334.
232. Gomes TAT, Hernandez RT, Torres AG, Salvador FA, Guth BEC, Vaz TMI, et al. Adhesin-encoding genes from shiga toxin-producing *Escherichia coli* are more prevalent in atypical than in typical enteropathogenic *E. coli*. *J Clin Microbiol*. 2011 Sep;49(9):3334–7.
233. Hua Y, Zhang J, Jernberg C, et al. Molecular characterization of the enterohemolysin gene (ehxA) in clinical shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates. *Toxins (Basel)* 2021; 13: 71.
234. Costa M, Londero A, Brusa V, et al. Characterization and molecular subtyping of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains in provincial abattoirs from the Province of Buenos Aires, Argentina, during 2016-2018. *Prev Vet Med* 2020; 183: 105133.
235. Tsutsuki H, Zhang T, Yahiro K, et al. Subtilase cytotoxin from shiga-toxigenic *Escherichia coli* impairs the inflammasome and exacerbates enteropathogenic bacterial infection. *SSRN Electron J*. Epub ahead of print 2021. DOI: 10.2139/ssrn.3956829.
236. Vélez MV, Colello R, Etcheverría AI, Vidal RM, Montero DA, Acuña P, et al. Distribution of Locus of Adhesion and Autoaggregation and hes Gene in STEC Strains from Countries of Latin America. *Curr Microbiol*. 2020 Sep;77(9):2111–7.
237. Gutiérrez S, Díaz L, Reyes-Jara A, Yang X, Meng J, González-Escalona N, et al. Whole-Genome Phylogenetic Analysis Reveals a Wide Diversity of Non-O157 STEC Isolated From Ground Beef and Cattle Feces. *Front Microbiol*. 2020;11:622663.
238. G M Gonzalez A, M F Cerqueira A. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in the animal reservoir and food in Brazil. *J Appl Microbiol* 2020; 128: 1568–1582.
239. Montero DA, Canto FD, Velasco J, et al. Cumulative acquisition of pathogenicity islands has shaped virulence potential and contributed to the emergence of LEE-negative Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains. *Emerg Microbes Infect* 2019; 8: 486–502.
240. Carter MQ, Quinones B, He X, Zhong W, Louie JW, Lee BG, et al. An Environmental Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O145 Clonal Population Exhibits High-Level Phenotypic Variation That Includes Virulence Traits. *Appl Environ Microbiol*. 2016 Feb 15;82(4):1090–101.
241. Peng Z, Liang W, Hu Z, Li X, Guo R, Hua L, et al. O-serogroups, virulence genes, antimicrobial susceptibility, and MLST genotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from swine and cattle in Central China. *BMC Vet Res*. 2019 Nov 29;15(1):427.

242. Martorelli L, Albanese A, Vilte D, Cantet R, Bentancor A, Zolezzi G, et al. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) O22:H8 isolated from cattle reduces *E. coli* O157:H7 adherence in vitro and in vivo. *Vet Microbiol*. 2017 Sep;208:8–17.
243. Coura FM, de Araújo Diniz S, Mussi JMS, Silva MX, Lage AP, Heinemann MB. Characterization of virulence factors and phylogenetic group determination of *Escherichia coli* isolated from diarrheic and non-diarrheic calves from Brazil. *Folia Microbiol*. 2017 Mar;62(2):139–44.
244. Ndegwa E, O'Brien D, Matthew K, et al. Shiga toxin subtypes, serogroups, phylogroups, RAPD genotypic diversity, and select virulence markers of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* strains from goats in mid-Atlantic US. *Microorganisms*. 2022 Sep 15;10(9). DOI: 10.3390/microorganisms10091842.
245. Gamage SD, Patton AK, Hanson JF, Weiss AA. Diversity and host range of Shiga toxin-encoding phage. *Infect Immun*. 2004 Dec;72(12):7131–9.
246. Tantoso E, Eisenhaber B, Kirsch M, et al. To kill or to be killed: pangenome analysis of *Escherichia coli* strains reveals a tailocin specific for pandemic ST131. *BMC Biol* 2022; 20: 146.
247. Tettelin H, Massignani V, Cieslewicz MJ, Donati C, Medini D, Ward NL, et al. Genome analysis of multiple pathogenic isolates of *Streptococcus agalactiae*: implications for the microbial “pan-genome”. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Sep 27;102(39):13950–5.
248. Lukjancenko O, Wassenaar TM, Ussery DW. Comparison of 61 sequenced *Escherichia coli* genomes. *Microb Ecol* 2010; 60: 708–720. <http://dx.doi.org/10.1007/s00248-010-9717-3>
249. Rasko DA, Rosovitz MJ, Myers GSA, Mongodin EF, Fricke WF, Gajer P, et al. The pangenome structure of *Escherichia coli*: comparative genomic analysis of *E. coli* commensal and pathogenic isolates. *J Bacteriol*. 2008 Oct;190(20):6881–93.
250. Ferdous M, Friedrich AW, Grundmann H, et al. Molecular characterization and phylogeny of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates obtained from two Dutch regions using whole genome sequencing. *Clin Microbiol Infect* 2016; 22: 642.e1–9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmi.2016.03.028>
251. Alonso MZ, Krüger A, Sanz ME, Padola NL, Lucchesi PMA. Serotypes, virulence profiles and stx subtypes of Shigatoxigenic *Escherichia coli* isolated from chicken derived products. *Rev Argent Microbiol*. 2016 Sep 22;48(4):325–8.
252. Commereuc M, Weill FX, Loukiadis E, Gouali M, Gleizal A, Kormann R, et al. Recurrent Hemolytic and Uremic Syndrome Induced by *Escherichia coli*. *Medicine*. 2016 Jan;95(1):e2050.
253. Oderiz S, Leotta GA, Galli L. Detección y caracterización de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga en niños atendidos en un hospital pediátrico interzonal de la ciudad de La Plata. *Rev Argent Microbiol* 2018; 50: 341–350. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ram.2017.08.008>.
254. Verhaegen B, De Reu K, Heyndrickx M, et al. Comparison of six chromogenic agar media for the isolation of a broad variety of non-O157 shigatoxin-producing *Escherichia coli* (STEC) serogroups. *Int J Environ Res Public Health* 2015; 12: 6965–6978.
255. Gill A, Huszczyński G, Gauthier M, et al. Evaluation of eight agar media for the isolation of shiga toxin-Producing *Escherichia coli*. *J Microbiol Methods* 2014; 96: 6–11.

ANEXO I – ANÁLISIS ESTADÍSTICO

A continuación, se muestran las salidas del programa de análisis PASW Statistics 18 para las distintas variables estudiadas:

Tabla de contingencia CT stx vs. Categoría animal

		Recuento			Total
		novillo	vaquillona	vaca	
CT stx	negativo	368	86	161	615
	positivo	102	44	33	179
	Total	470	130	194	794(*)

(*) No suma 800 porque para el análisis sacamos toro y terneros n=6.

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	,035 ^a	1	,852		
Corrección por continuidad ^b	,003	1	,959		
Razón de verosimilitudes	,035	1	,851		
Estadístico exacto de Fisher				1,000	,487
Asociación lineal por lineal	,035	1	,852		
N de casos válidos	800				

a. 0 casillas (,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 19,69.

b. Calculado sólo para una tabla de 3x2.
p=0.0019.

Tabla de contingencia CT stx vs.Tipo de Frigorífico

	Recuento		
	Tipo de Frigorifico		Total
	Exportacion	Abasto	
CT stx negativo	594	27	621
positivo	143	36	179
Total	737	63	800

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	47,594 ^a	1	,000		
Corrección por continuidad ^b	45,446	1	,000		
Razón de verosimilitudes	39,307	1	,000		
Estadístico exacto de Fisher				,000	,000
Asociación lineal por lineal	47,535	1	,000		
N de casos válidos	800				

a. 0 casillas (,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 14,10.

b. Calculado sólo para una tabla de 2x2.
p=0.001.

Tabla de contingencia CT stx vs. Tipo de Faena

Recuento

	TIPO de FAENA			Total
		Común	Kosher	
CT stx negativo	13	531	57	601
positivo	8	143	20	171
Total	21	674	77	772(**)

(**) 8 muestras no tenían el dato

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	4,090 ^a	2	,129
Razón de verosimilitudes	3,690	2	,158
N de casos válidos	772		

a. 1 casillas (16,7%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5.

La frecuencia mínima esperada es 4,65.

p=0.5977

Tabla de contingencia CT stx vs. Tipo de Alimentación

		Recuento		
		Tipo de Alimentación		Total
		pasto	corral	
CT stx	negativo	552	69	621
	positivo	160	19	179
	Total	712	88	800

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	,035 ^a	1	,852		
Corrección por continuidad ^b	,003	1	,959		
Razón de verosimilitudes	,035	1	,851		
Estadístico exacto de Fisher				1,000	,487
Asociación lineal por lineal	,035	1	,852		
N de casos válidos	800				

a. 0 casillas (,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 19,69.

b. Calculado sólo para una tabla de 2x2.
p=0,9470

Tabla de contingencia CT stx vs. meses del año

Recuento

	MESG		Total
	MESES CÁLIDOS	MESES FRIOS	
CT stx negativo	299	322	621
positivo	98	81	179
Total	397	403	800

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	13,103 ^a	2	,001
Razón de verosimilitudes	12,454	2	,002
Asociación lineal por lineal	,463	1	,496
N de casos válidos	794		

a. 0 casillas (,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 29,31.

p=0,1197

Tabla de contingencia CT stx vs.INTERVENCIÓN DECLARADA

Recuento

	INTERVENCIÓN		Total
	Sin intervención declarada	Con intervención declarada	
CT stx negativo	204	409	613
positivo	86	90	176
Total	290	499	789(***)

(***) 11 muestras no tenían el dato

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	14,287 ^a	1	,000		
Corrección por continuidad ^b	13,625	1	,000		
Razón de verosimilitudes	13,957	1	,000		
Estadístico exacto de Fisher				,000	,000
Asociación lineal por lineal	14,269	1	,000		
N de casos válidos	789				

a. 0 casillas (,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 64,69.

b. Calculado sólo para una tabla de 2x2.

P=0.0002

Tabla de contingencia CT stx vs. Pelos Visibles en el momento de obtener las muestras

		Recuento		Total
		Pelos Visibles		
		NO	SI	
CT stx	negativo	411	210	621
	positivo	82	97	179
	Total	493	307	800

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	24,388 ^a	1	,000		
Corrección por continuidad ^b	23,534	1	,000		
Razón de verosimilitudes	23,860	1	,000		
Estadístico exacto de Fisher				,000	,000
Asociación lineal por lineal	24,358	1	,000		
N de casos válidos	800				

a. 0 casillas (,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 68,69.

b. Calculado sólo para una tabla de 2x2.

p=0.0001

CT stx

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	0	621	77,6	77,6	77,6
	(neg)				
	20	1	,1	,1	77,8
	21	4	,5	,5	78,3
	22	5	,6	,6	78,9
	23	8	1,0	1,0	79,9
	24	4	,5	,5	80,4
	25	1	,1	,1	80,5
	25	6	,8	,8	81,3
	26	10	1,3	1,3	82,5
	27	11	1,4	1,4	83,9
	28	14	1,8	1,8	85,6
	28	1	,1	,1	85,8
	29	4	,5	,5	86,3
	30	12	1,5	1,5	87,8
	31	11	1,4	1,4	89,1
	32	10	1,3	1,3	90,4
	33	10	1,3	1,3	91,6
	34	12	1,5	1,5	93,1
	34	1	,1	,1	93,3
	35	19	2,4	2,4	95,6
	36	9	1,1	1,1	96,8
	37	1	,1	,1	96,9
	38	8	1,0	1,0	97,9
	40	3	,4	,4	98,3
	39	5	,6	,6	98,9
	41	7	,9	,9	99,8
	42	1	,1	,1	99,9
	43	1	,1	,1	100,0
	Total	800	100,0	100,0	

DOCUMENTO PARA ELABORAR ACTA EMITIDA POR BEDELÍA DE LA ESCUELA DE GRADUADOS

TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS

Título: “*Caracterización de Escherichia coli productora de toxina Shiga (STEC) en canales bovinas uruguayas*”

De: Ing. Alim. MSc. Paula Mussio

Día: 6 de octubre

Hora: 10:30

Lugar: Instituto de Higiene – Salón “Elbio Gezuele”

INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL:

Presidente: PhD Inés Bado

Vocales: PhD Isabel Chinen y PhD Sylvia Vázquez

Director Académico:

Profesor Dr. Gustavo Varela

Tutor de la Especialidad: Dr. Gerardo Leotta

Fallo del Tribunal Nota¹ _____Excelente_____ Escala numérica²: ___10___ -

JUICIO COMPLEMENTARIO ESCRITO (HASTA UN MÁXIMO DE 300 PALABRAS).

Es un trabajo original que plantea profundizar en un tema de relevancia país e internacional que aporta al conocimiento de cepas circulantes de STEC en Uruguay.

La estudiante propuso un diseño de estudio desafiante planteando un muestreo representativo en una etapa crucial de la línea de producción e integrando en el análisis de los resultados de SGC, diferentes variables que fueron consideradas de importancia para evaluar medidas de intervención apropiadas.

Se plantea un proyecto completo, que aplica diversas técnicas de aislamientos, feno y genotípicas, análisis y comparación de las mismas. Utiliza y aprovecha varias de las herramientas informáticas disponibles para el análisis de genomas completos secuenciados de *E. coli*, esencial para la formación de recursos humanos en bioinformática en nuestro país.

• ¹Excelente. Muy satisfactorio. Satisfactorio. Aceptable y No aprobado.

• ²Utilizar escala de 1 al 12

Proinbio

Escuela de Graduados – Facultad de Medicina

UDELAR

Además, discute sus resultados ordenadamente y los compara con la epidemiología local y mundial, encontrando similitudes y diferencias, las cuales sabe interpretar y cuestionar.

Contribuye a su vez a la vigilancia global en RAM y en línea con los conceptos de Una Salud de la tripartita OMS, FAO y OMSA.

Esta tesis marca el punto de inicio de la vigilancia genómica en ganado bovino con impacto directo en salud pública y en la economía nacional y regional.



Prof. Adj. PhD Inés Bado
Unidad Académica Bacteriología y Virología
Facultad de Medicina
Universidad de la República



Dra. Msc. Lic. Sylvia Vazquez Zeballos
Director (I) Laboratorio de Microbiología
Laboratorio de Bromatología
Servicio de Regulación Alimentaria
División Salud. Intendencia de Montevideo



Dra. Isabel Chinen.
Servicio Fisiopatogenia
Departamento Bacteriología
INEI-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán"
Av. Vélez Sarsfield 563 – CABA
Argentina

FIRMA DE LOS INTEGRANTES DEL TRIBUNAL.